



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACION DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES
MUSCARÍNICOS IMPLICADOS EN LA ACCIÓN
ANTAGONISTA DE BERBERINA SOBRE MÚSCULO LISO
DE TRÁQUEA DE COBAYO”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

HERNÁNDEZ SALAZAR CHRISTY



MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Andrés Navarrete Castro**

VOCAL: **Profesor: Elena Guadalupe Ramírez López**

SECRETARIO: **Profesor: José Fausto Rivero Cruz**

1er. SUPLENTE: **Profesor: María Eva González Trujano**

2° SUPLENTE: **Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto E, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Departamento de Farmacia, Laboratorio 126.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Andrés Navarrete Castro

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Luis Balderas López

SUSTENTANTE:

Christy Hernández Salazar

ÍNDICE TEMÁTICO

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Las vías aéreas y el músculo liso bronquial	3
3.2 Regulación del sistema colinérgico en la contracción del músculo liso de las vías aéreas.....	4
3.3 Las proteínas G.....	7
3.3.1 Bronco constricción a través de los receptores acoplados a proteínas G _q	8
3.3.2 Broncoconstricción y broncorelajación a través de los receptores acoplados a proteínas G _{i/o} y proteínas G _s	10
3.4 Caracterización de los receptores muscarínicos.....	12
3.5 Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias	15
3.6 Los alcaloides	16
3.6.1 Las protoberberinas.....	16
3.6.2 La Berberina	17
3.7 Potencia Relativa antagonista (pA ₂).....	18
4. Planteamiento del problema	21
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	22
6.1 Objetivo general	22
6.2 Objetivos específicos	22
7. Material y métodos	23
7.1 Fármacos	23
7.2 Animales	23
7.3 Ensayos biológicos	23
7.3.1 Disección de la tráquea y estabilización del tejido.....	23
7.3.2 Evaluación del efecto contráctil de los fármacos agonistas.....	
7.3.3 Efecto antagonista de la berberina	24

7.3.4 Efecto antagonista de la berberina en presencia de 2'5'-dideoxiadenosina	24
7.3.5 Análisis estadístico y cálculo de parámetros	25
8. Resultados	26
9. Discusión de resultados	37
10. Conclusiones	43
11. Perspectivas	44
12. Referencias	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Caracterización de los subtipos de receptores muscarínicos	13
Cuadro 2. Valores de CE_{50} de carbacol en ausencia y presencia de berberina ...	29
Cuadro 3. Valores de CE_{50} de carbacol en ausencia y presencia de berberina ...	31
Cuadro 4. Valores de CE_{50} de oxotremorina en ausencia y presencia de berberina	33
Cuadro 5. Valores de CE_{50} de acetilcolina en ausencia y presencia de berberina	36
Cuadro 6. Valores de CE_{50} de los fármacos contráctiles en ausencia de berberina y el valor de pA_2 obtenido para cada uno de ellos	36
Cuadro 7. Valores de CE_{50} de carbacol en ausencia y presencia de berberina y de 2', 5'-dideoxiadenosina.....	39

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1. Receptores colinérgicos muscarínicos acoplados a proteínas G	5
Esquema 2. Receptores colinérgicos en vía aéreas.....	6
Esquema 3. Señalización a través de los receptores acoplados a proteína G_q en el músculo liso de vía aéreas	10
Esquema 4. Señalización a través de los receptores acoplados a proteína G_i/o y proteínas G_s en el músculo liso de vía aéreas.....	12

Figura 1. Estructura de berberina.....	17
Figura 2. Contracción experimental del anillo aislado de tráquea en presencia de 2', 5'-dideoxiadenosina (a) y berberina (b) con respecto a la contracción basal .	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva concentración-respuesta de la contracción en gramos fuerza de los fármacos agonistas de los receptores muscarínicos	27
Gráfica 2. Curva de contracción de carbacol en presencia de berberina	28
Gráfica 3. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con respecto a carbacol.....	29
Gráfica 4. Curva de contracción inducida por pilocarpina en presencia de berberina	30
Gráfica 5. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con respecto a pilocarpina.....	31
Gráfica 6. Curva de contracción inducida por oxotremorina en presencia de berberina	32
Gráfica 7. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con respecto a oxotremorina.	33
Gráfica 8. Curva de contracción inducida por acetilcolina en presencia de berberina	35
Gráfica 9. Curva de contracción inducida por carbacol en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina 10 μ M, berberina 100 μ M y 2',5'-dideoxiadenosina 10 μ M en presencia de berberina 100 μ M.....	38

1. RESUMEN

La berberina es uno de los principios activos identificados en *Argemone ochroleuca*; es un alcaloide isoquinolínico, con efectos antagonistas sobre los receptores colinérgicos muscarínicos¹, del cual no se tiene la evidencia suficiente sobre el subtipo de receptor que media su acción.

En el presente trabajo se estudió la acción antagonista de berberina sobre receptores M₃ en relación a los receptores M₂, esperando que berberina antagonizará con mayor potencia las contracciones inducidas por pilocarpina, que es un agonista preferentemente M₃, con respecto a las contracciones inducidas por oxotremorina, un agonista con preferencia por los receptores muscarínicos M₂ en tráquea de cobayo, correlacionando estos datos con respecto a agonistas muscarínicos inespecíficos de los receptores colinérgicos (carbacol y acetilcolina).

Para este estudio se utilizó el modelo de tráquea aislada de cobayo. Se realizaron curvas de contracción para cada uno de los fármacos agonistas en presencia y en ausencia de berberina a diferentes concentraciones, para calcular los valores de pA₂ correspondientes para pilocarpina (4.686 ± 0.307), para carbacol (4.188 ± 0.33) y oxotremorina (4.294 ± 1.036). En el caso de acetilcolina no se logró determinar el valor de pA₂ a las concentraciones de berberina empleadas. Los valores de pA₂ no presentaron diferencia significativa entre ellos, por lo que se realizaron las curvas de carbacol en presencia y en ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina y berberina. La 2',5'-dideoxiadenosina 10 µM, un inhibidor de la adenilato ciclasa, no modificó la curva de concentración respuesta de carbacol (CE₅₀ = 0.183 ± 0.041 µM vs CE₅₀ = 0.120 ± 0.0075 µM) en tanto que, la 2',5'-dideoxiadenosina a esta concentración inhibió el efecto antagonista de berberina 100 µM (CE₅₀ = 5.908 ± 1.357 µM vs 1.103 ± 0.222 µM). Además de observarse un efecto contrario entre berberina 100 µM y 2',5'-dideoxiadenosina 10 µM con respecto al tono basal de la musculatura lisa traqueal. Estos resultados sugieren que el efecto de berberina se debe a la activación de adenilato ciclasa y no debido a su acción sobre los receptores colinérgicos.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias crónicas tiene una alta incidencia en todo mundo² y presentan una elevada prevalencia debido a los diferentes factores del medio como son: los cambios climáticos, el aumento en los niveles de azufre y ozono (contaminación atmosférica), el aumento en el consumo de tabaco activo y pasivo, la variedad de tóxicos ambientales y laborarles, los cambios de temperatura y los cambios morfológicos y funcionales del epitelio respiratorio³.

Existen diversos tratamientos para contrarrestar los problemas respiratorios como es el uso de antiinflamatorios y broncodilatadores, tales como antihistamínicos, anticolinérgicos, antileucotrienos, xantinas y β -adrenergicos^{5, 23}. Además del tratamiento farmacológico, en la medicina tradicional mexicana existen diversos productos naturales para el tratamiento de dichas enfermedades, por lo que resulta de gran importancia, conocer los principios activos que llevan a cabo los efectos farmacológicos deseados y por ende el mecanismo mediante el cual ejercen su acción.

Para el caso de *Argemone ochroleuca*, utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias como: tos, bronquitis y asma⁴, se ha determinado la presencia de alcaloides, identificado como uno de los principios activos el alcaloide berberina, cuyos efectos antagonistas sobre los receptores colinérgicos muscarínicos han sido estudiados^{4,22} y cuya acción es similar al de otros antagonistas muscarínicos utilizados en tratamientos de asma y de enfermedades obstructivas crónicas⁴, pero se desconoce el subtipo de receptor muscarínico que media su acción.

En el presente trabajo se estudió a los subtipos de receptores muscarínicos implicados en el efecto relajante de berberina sobre músculo liso de tráquea de cobayo con el fin de poder dilucidar con certeza el mecanismo por el cual actúa y la selectividad a un subtipo de receptor muscarínico en vías aéreas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Las vías aéreas y el músculo liso bronquial

El sistema respiratorio lleva a cabo el proceso de la respiración, trabajando en conjunto con el sistema circulatorio para suministrar oxígeno a los tejidos y transportar el dióxido de carbono a los pulmones para ser exhalado, por lo que, tienen como función asegurar el intercambio gaseoso entre el aire atmosférico y la sangre^{6, 7}. El sistema respiratorio, se conforma por vías aéreas altas, medias y bajas. Las primeras están formadas por las fosas nasales y la boca, las vías aéreas medias conocidas como vías conductuales o de conducción y comprenden la faringe, la laringe y la tráquea, mientras que las inferiores, en las cuales se lleva a cabo el intercambio gaseoso se encuentran los bronquios y los bronquiolos^{6, 7}.

Las vías aéreas se conforman por estructuras anatómicas como: el músculo liso, el epitelio ciliado y las glándulas bronquiales, siendo de gran interés farmacológico el tejido epitelial y el músculo liso. El epitelio está adaptado para defender la mucosa mediante el aclaramiento mucociliar, la regulación de líquido en las vías aéreas, la producción de mediadores de la inflamación y como fuente de óxido nítrico (NO); en el caso del músculo liso bronquial (MLB), su función es la regulación del flujo de aire mediante el control del tono muscular^{5, 7, 8}. En cuanto a las glándulas bronquiales, las cuales se componen de dos tipos de células secretoras: las serosas y las mucosas, su función es producir a la mucina para formar una barrera protectora entre el epitelio de las vías aéreas y el medio ambiente⁹. El calibre del músculo liso bronquial depende de la submucosa, las secreciones luminales y del tono muscular, siendo éste último el factor más importante en el flujo del aire a través del sistema respiratorio¹⁰.

En los seres humanos, la tráquea, es un conducto semirrígido fibromusculocartilaginoso de 11 a 13 cm de longitud, la cual varía con la edad y la talla, se extiende entre la laringe y los bronquios, situándose por delante del

esófago. Está formada por alrededor de 15 a 20 anillos cartílago hialino (en forma de C) cuya altura varía de 2-5 mm y se encuentran recubiertos por mucosa ciliada, que dan firmeza a la pared y evitan que se colapse. Los anillos permiten que se extienda y descienda durante la inspiración y ayuda a la retracción pulmonar durante la espiración^{11,12}.

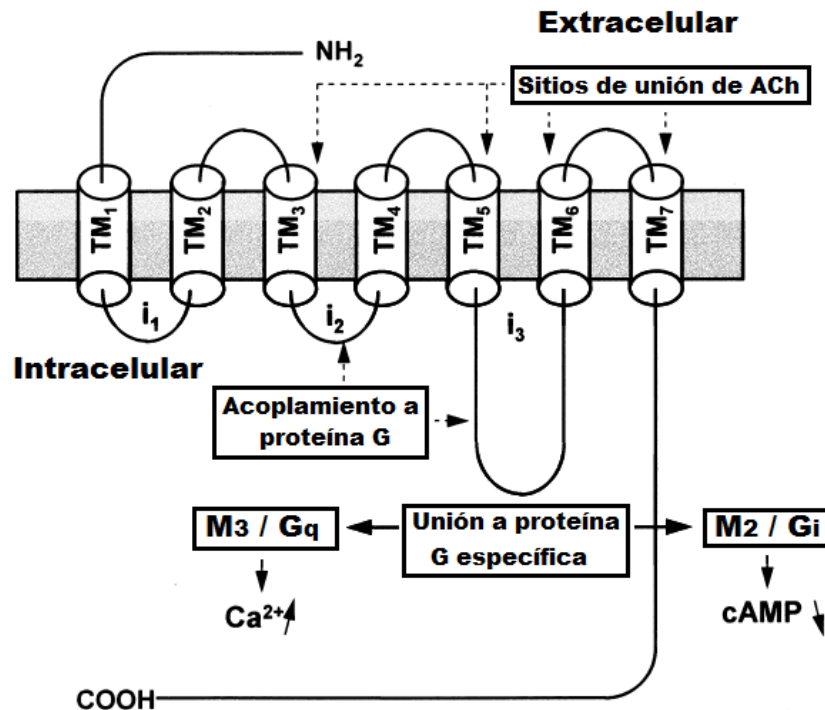
3.2 Regulación del sistema colinérgico en la contracción del músculo liso de las vías aéreas

El sistema colinérgico en el tracto respiratorio juega un papel muy importante en la regulación del tono muscular de las vías aéreas, siendo el sistema nervioso parasimpático el principal encargado de la broncoconstricción en las vías aéreas. Las fibras colinérgicas viajan a través del nervio vago hasta el ganglio parasimpático dentro de las paredes aéreas. Desde el ganglio, las pequeñas fibras postsinápticas inervan al músculo liso y las glándulas. La acetilcolina es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, se libera tanto en la sinapsis ganglionar como en la sinapsis postganglionar y actúa por medio de la activación de los colinoreceptores¹³.

Existen dos clases de colinoreceptores: los receptores muscarínicos y los nicotínicos¹⁴. Los receptores nicotínicos se encuentran en el ganglio parasimpático y median la transmisión ganglionar¹³. Están ligados a canales iónicos dependientes del ligando, su activación causa una afluencia de iones positivos como sodio ($\uparrow \text{Na}^+$), calcio ($\uparrow \text{Ca}^{2+}$) y potasio ($\downarrow \text{K}^+$), lo que provoca la despolarización de la membrana. Están formados por 5 subunidades homólogas o idénticas dispuestas de manera que puedan construir un poro central.

Existen muchas isoformas de receptores nicotínicos. Los receptores nicotínicos del músculo están formado por dos subunidades α , una unidad β , una γ o ϵ y una subunidad δ donde los receptores nicotínicos neuronales están compuestos solo por dos subtipos diferentes de subunidades (α y β) o cinco subunidades α ¹³.

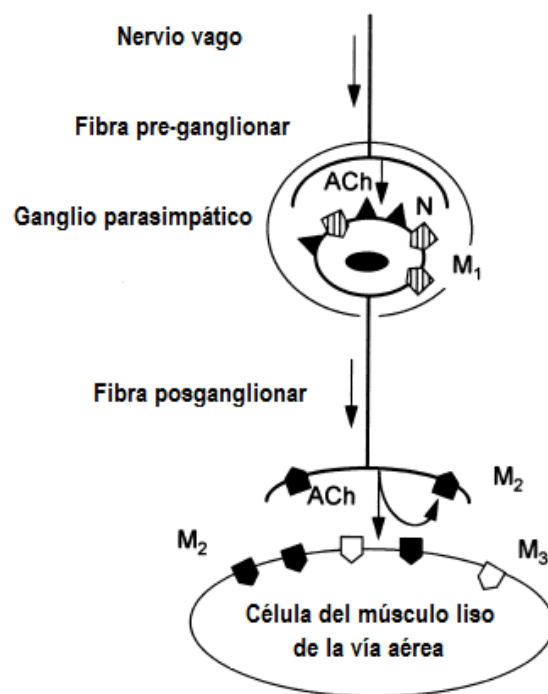
Por otra parte, los receptores muscarínicos, mostrados en el **Esquema 1**, pertenecen a una larga familia de receptores acoplados a proteínas G triméricas y se han identificado 5 subtipos (M_1 - M_5). Se caracterizan por tener 7 regiones transmembranales conectadas por azas intra y extracelular. Entre las regiones 4, 5 y 6, poseen dos azas intracelulares (i_2 e i_3), siendo el aza de mayor longitud intracelular (i_3) la responsable del acoplamiento selectivo a una proteína G¹³.



ESQUEMA 1. Receptores colinérgicos muscarínicos acoplados a proteínas G. Esta superfamilia de receptores cuenta con 7 dominios transmembranales (TM₁-TM₇). La acetilcolina se une por una hendidura formada en la parte extracelular de cada uno de los siete dominios transmembranales, en particular a los residuos de aminoácidos localizados en la tercera, quinta, sexta y séptima región transmembranal. Entre la tercera aza intracelular (i_2 e i_3), así como, la parte intracelular de la membrana proximal de la cola terminal de los receptores están implicados en el acoplamiento a una proteína G específica. Los colinoreceptores M_2 están acoplados a la proteína G_i inhibiendo principalmente a la adenilato ciclasa y disminuyendo el AMPc. Los colinoreceptores M_3 están acoplados a la proteína $G_{q,11}$, activando la fosfolipasa C e incrementando el Ca^{2+} intracelular¹³.

Los receptores muscarínicos están expresados en todas las células de las vías aéreas y pulmón, en las cuales se han identificado principalmente los receptores de tipo M_1 , M_2 y M_3 [Esquema 2], siendo los receptores de mayor población los

receptores M_2 y M_3 , limitándose la expresión de M_1 al tejido pulmonar periférico y a la pared alveolar¹⁴. Los receptores M_1 , están ubicados en los ganglios parasimpáticos y facilitan la neurotransmisión. Los receptores M_2 se encuentran tanto a nivel presináptico (regulando la liberación de acetilcolina), como a nivel postsináptico (acoplados a proteínas G_i , inhibiendo la activación de Adenilato ciclasa)^{15, 16}. Los receptores M_3 se encuentran en el sitio postsináptico acoplados a proteínas G_q . En el músculo liso bronquial, predomina la población de receptores M_2 , siendo la proporción de estos de 4:1 con respecto a los M_3 , esta proporción, varía ligeramente dependiendo de la especie^{5, 7, 18}.



ESQUEMA 2. Receptores colinérgicos en vía aéreas. La transmisión ganglionar es mediada por los receptores nicotínicos (N) y facilitada por los receptores muscarínicos M_1 . La acetilcolina (ACh) se libera y actúa como neurotransmisor, uniéndose a los receptores muscarínicos M_2 y M_3 , localizados en las células del músculo liso de las vías aéreas. Además, la acetilcolina actúa como autoinhibidor de los receptores muscarínicos M_2 presentes en las terminaciones de los nervios postganglionares¹³.

Bajo condiciones fisiológicas, la contracción inducida por acetilcolina en músculo liso de las vías aéreas es mediada por los receptores muscarínicos, principalmente por los receptores de tipo M_3 ¹⁴, por ende, se ha establecido que los M_3 son los responsables de la contracción del músculo liso, siendo los M_2 un mecanismo concomitante de la activación de los receptores M_3 , aumentando la respuesta¹⁴.

Asimismo, existen estudios en los cuales se reporta un papel contráctil de los receptores M_2 cuando los receptores M_3 se encuentran bloqueados^{17, 18}. Otros reportes sugieren que los receptores M_2 llegan a desempeñar dos papeles: a corto plazo, inhiben a la adenilato ciclasa y a largo plazo, regulan la sobre expresión de esta enzima contrarrestando la acción de los agonistas de los receptores M_3 acoplados a la enzima fosfolipasa C^{20} . En resumen, los receptores muscarínicos inducen la contracción del músculo de las vías aéreas mediante los receptores M_3 , mientras que los receptores M_2 , se encargan de mediar la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, contribuyendo a la prevención de la broncodilatación^{13, 15, 18, 20}.

3.3 Las proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés), son la familia más grande de moléculas de la superficie celular involucradas en la transmisión de señales. Estos receptores son activados por una extensa variedad de ligando incluyendo péptidos y no péptidos, neurotransmisor, hormonas, factores de crecimiento y luz¹⁴.

El acoplamiento del sistema efector celular de los receptores muscarínicos está mediado por la vía heterotrimétrica de la proteína G. La proteína G está compuesta por una subunidad α , β y γ . Están clasificadas con respecto a su subunidad α y se han identificado más de 20 diferentes subunidades α , 5 subunidades β y diez subunidades γ . Basados en la secuencia primaria de homología de la subunidad α , la proteína G está subdividida en 4 familias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$ ¹⁴.

La activación del receptor da lugar a la disociación de la proteína G heterotrimétrica en dos subunidades: α y β/γ , ambas subunidades están involucradas en señales de traducción muscarínicas. Las diferentes unidades α de la proteína G son conocidas por mediar diferentes señalamientos celulares, por lo que los diferentes receptores muscarínicos se acoplan diferente a las múltiples proteínas G. Los receptores muscarínicos “impares” (M_1 , M_3 y M_5) prefieren acoplarse con las

proteínas G de la familia G_q , en cambio los receptores “pares” tienen preferencia por los receptores acoplados a la familia $G_{i/o}$.

Uno de los blancos importantes de activación de las proteínas G_q es la fosfolipasa C mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP_2) para generar inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). En el caso de las proteínas acopladas a la proteína $G_{i/o}$ están relacionadas con la adenilato ciclasa en la inhibición de manera directa o indirecta del potasio y los canales iónicos no selectivos^{11, 13, 14}.

En todas las células del músculo liso bronquial, están presentes los receptores M_2 y M_3 , por lo que los segundos mensajeros toman gran importancia en la estimulación y la respuesta del tejido en presencia de fármacos o moléculas endógenas.

3.3.1 Bronconstricción a través de los receptores acoplados a proteínas G_q

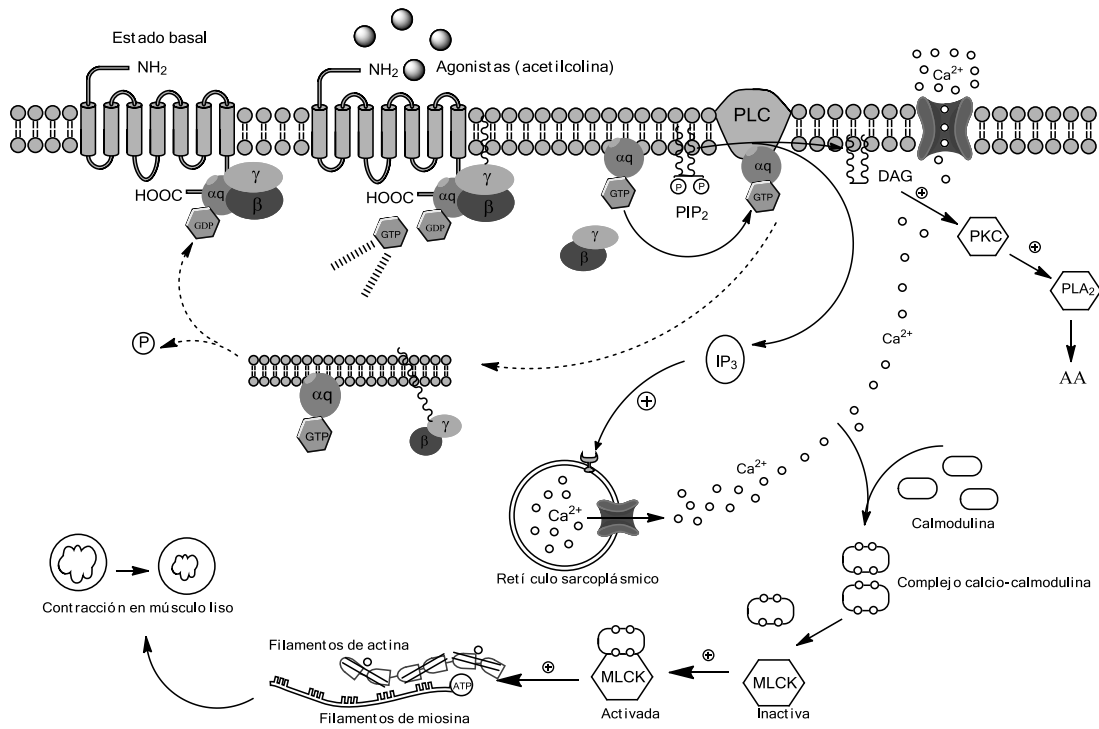
La contracción del músculo liso puede ser inducida por una despolarización o por una estimulación de agonistas contráctiles que están relacionados con un incremento de las concentraciones de calcio intracelular. El MLB puede ser contraído por vías directas que involucran a los receptores acoplados a proteínas G o indirectas que involucren la liberación de otros mediadores^{11, 21}.

Los receptores de acetilcolina (Ach, por su abreviatura en inglés), principalmente los M_3 , se encuentran acoplados a proteínas $G_{q/11}$, siendo los principales mediadores de la contracción en músculo liso bronquial. Este receptor, es capaz de inducir la contracción por la activación secuencial del receptor, como se muestra en el **Esquema 3**.

Al llevarse a cabo la unión del agonista con el receptor, éste induce un cambio conformacional en el mismo, provocando con ello la activación de la subunidad α y

la disociación de las subunidades $\beta\gamma$; la subunidad $G\alpha$ activa a la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) la cual promueve la hidrólisis del fosfoinositol-4,5-difosfato (PIP_2 , por sus siglas en inglés) dando lugar a los segundos mensajeros intracelulares 1,2-diacilglicerol (DAG, por sus siglas en inglés) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3 por sus siglas en inglés)^{5,11}. El DAG se une a la membrana, activando con ello a la cinasa C de proteínas (PKC), que es capaz de fosforilar a diferentes sustratos, entre ellos: intermediarios de la vía de las MAPK (cinasa de la proteína activada por mitógeno) induciendo la activación de diferentes factores de transcripción involucrados en promover el crecimiento de las vía aéreas, además, estimular la actividad catalítica de la fosfolipasa A_2 (PLA_2 , por sus siglas en inglés) que induce la formación de mediadores de la inflamación a partir del ácido araquidónico (AA)^{6, 11, 22, 23}.

Por otro lado, el producto de hidrólisis, 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) se une a un receptor en el retículo sarcoplásmico lo cual resulta en la apertura de canales de calcio y el flujo del ión hacia el citosol. El incremento del calcio libre intracelular, promueve la unión del calcio a la calmodulina formando un complejo que es capaz de activar a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLKC, por sus siglas en inglés), fosforiándola y permitiendo su interacción con la actina para inducir la activación de la ATPasa de la miosina y llevar a cabo la contracción^{11, 23}.



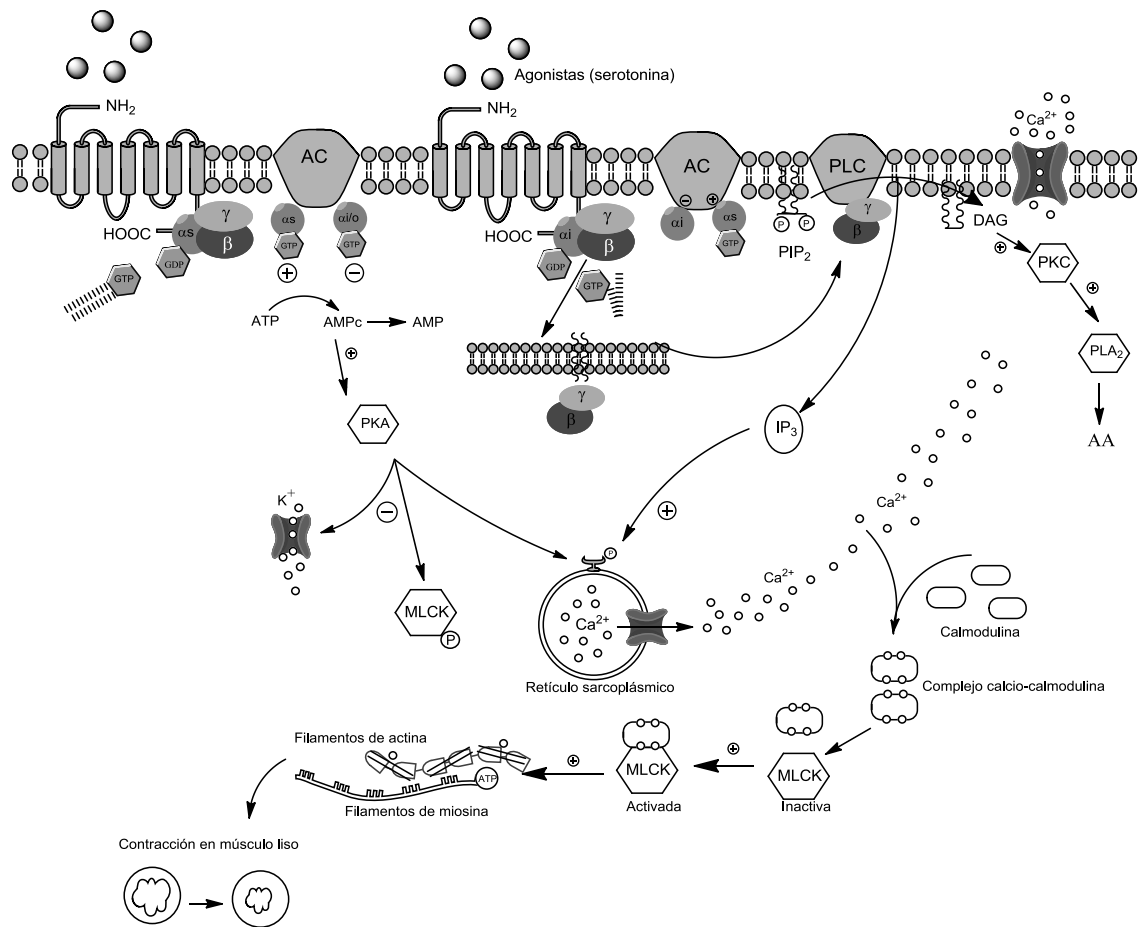
ESQUEMA 3. Señalización a través de los receptores acoplados a proteína Gq en el músculo liso de vía aérea. El músculo liso está inervado por nervios parasimpáticos posganglionares que liberan acetilcolina para controlar la resistencia del tono muscular. PIP₂= fosfoinositol-4,5-difosfato, PLC = fosfolipasa C, DAG= Diacilglicerol, IP₃ =inositol 1,4,5,Trifosfato, PKC = Cinasa C de proteínas, MLCK= cinasa de la cadena ligera de miosina, PLA₂ = fosfolipasa A₂, AA =ácido araquidónico. **Modificada de Billington, 2003**²².

3.3.2. Bronconstricción y broncorelajación a través de los receptores acoplados a proteínas G_{i/o} y proteínas G_s

En el músculo liso bronquial, se expresan además de los receptores M₃, los receptores M₂, los cuales están acoplados a proteínas inhibitorias (G_i). Como se observa en el **Esquema 4**. Estos receptores pueden iniciar o modular la señalización a través de las acciones derivadas de las subunidades α y la disociación de las subunidades βγ. Cuando se disocian las subunidades G_{ai} del complejo, se unen a la adenilato ciclasa (AC), actuando como un modulador negativo de la señalización inducida por G_{os}. La subunidad βγi activa a la fosfolipasa C (PLC), lo que resulta en la generación de los fosfoinositidos, la activación de la PKC vía DAG y la movilización del calcio en el músculo liso^{11, 22,}

Los receptores acoplados a proteína G_s son los principales mediadores de la contracción del músculo liso bronquial, cuya función es promover la relajación cuando el músculo se encuentra contraído y son activados principalmente por agentes endógenos como: las catecolaminas (β_2 -adrenergicos), las prostanglandinas (PGE_2), la adenosina (A_2b) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés). La proteína G_s está acoplado a adenilato ciclasa (AC) que bajo condiciones fisiológicas se activa por interacción con $G_{\alpha s}$ (existen 9 isoformas de AC siendo las V y VI las expresadas en el músculo liso de vías aéreas).

La AC activada cataliza la formación a AMPc a partir de ATP citoplasmático. El AMPc es un segundo mensajero cuya función principal es la activación de la cinasa A de proteínas (PKA). La PKA se encuentra inactivada como un complejo de dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas, su gran afinidad por el AMPc en los dominios de la región reguladora inducen un cambio conformacional, forzando la liberación de las subunidades catalíticas activadas, y fosforilan a varias proteínas intracelulares que tienen efectos sobre el músculo liso. La PKA fosforila al receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol, reduciendo su afinidad por el IP_3 , por lo que limita la movilización del flujo de calcio. PKA fosforila a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) provocando que disminuya la afinidad por el complejo calcio-calmodulina y reduciendo la actividad de fosforilación de la cadena ligera de miosina. Además, la PKA fosforila los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}^{2+}), aumentando su tiempo de apertura y el flujo de potasio (K^+) induciendo una hiperpolarización de la membrana²⁴.



ESQUEMA 4. Señalización a través de los receptores acoplados a proteína Gi/o y proteínas Gs en el músculo liso de vía aérea. AC= Adenilato ciclasa, ATP= Adensin trifosfato, AMPc = adensin monofosfto cíclico, AMP= Adenosin monofosfato PIP₂= fosfoinositol-4,5-difosfato, PLC = fosfolipasa C, DAG= Diacilglicerol, IP₃=inositol 1,4,5,Trifosfato, PKC = Cinasa C de proteínas, PKA = Cinasa A de proteínas, MLCK= cinasa de la cadena ligera de miosina, PLA₂ = fosfolipasa A₂, AA =ácido araquidónico. **Modificada de Billington, 2003**²³.

3.4 Caracterización de receptores muscarínicos

La clasificación farmacológica, así como, la localización de los receptores ha permitido la existencia de fármacos agonistas y fundamentalmente de antagonistas con selectividad para cada subtipo²³. En el caso de los antagonistas muscarínicos, por criterio farmacológico, existen 4 subtipos de receptores muscarínicos diferentes en vía aérea M₁, M₂, M₃, M₄, los cuales se han identificado mediante el uso de antagonistas selectivos¹³. Además de la atropina, antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, los antagonistas

comúnmente utilizados para la identificación de los subtipos de receptores en músculo liso son: pirenzepina (selectivo M_1), metoctramina, (selectivo M_2/M_4), AF-DX 116 (selectivo M_2/M_4), 4-DAMP (1,1-Dimetil-4-difenilacetoxipiperidinio yodado, selectivo M_3), entre otros, como los mostrados en la **Cuadro 1**. Sin embargo, la selectividad de estos antagonistas está definida por su afinidad a varios receptores, cuyo rango va de 10-100 veces, en una población de receptores mixta^{13, 14}.

Cuadro 1. Caracterización de los subtipos de receptores muscarínicos mediante el uso de antagonistas selectivos y su localización en las vía aéreas.

Subtipo de receptor	Antagonista selectivo	Rango de afinidad	Genes	Localización en el tejido de vías aéreas
M_1	Pirenzepina	$M_1 > M_4 > M_3 > M_2$	m_1	Ganglios parasimpáticos, glándulas submucosas y paredes alveolares
	Telenzepina	$M_1 > M_4 > M_3 > M_2$		
M_2	Metoctramina	$M_2 > M_4 > M_1 > M_3$	m_2	Nervios postganglionares y músculo liso de vías aéreas
	Himbacina	$M_3 > M_1 > M_4 > M_2$		
M_3	4-DAMP	$M_3 > M_1 > M_4 > M_2$	m_3	Músculo liso de vías aéreas, glándulas, submucosas y células epiteliales
	p-F-HHSiD	$M_3 > M_1 > M_4 > M_2$		
M_4	-	-	m_4	Solamente se encuentran en conejo: músculo liso y alvéolo
M_5	-	-	m_5	No identificado en pulmón

En el caso de los agonistas muscarínicos, estos simulan los efectos de la estimulación de nervios parasimpático. El carbacol, es un fármaco parasimpaticomimético que estimula tanto a los receptores muscarínicos como a los nicotínicos. Es un potente agente colinérgico que produce la constricción del iris y del cuerpo ciliar, produciendo la reducción de la presión intracelular²⁵, actúa de manera inespecífica sobre la activación de los receptores muscarínicos y presenta un comportamiento de agonista total. En el caso de pilocarpina, un alcaloide isoquinolínico empleado como fármaco oftálmico colinérgico, obtenido de las hojas de *Pilocarpus sp.*, empleado para el tratamiento del glaucoma crónico, por producir contricción ocular, el espasmo y el incremento transitorio de la presión intraocular. Actúa sobre los receptores M₃, que se encuentran en las glándulas salivales y lagrimales, promoviendo la secreción glandular. Los pacientes asmáticos reaccionan a la pilocarpina, lo que puede desencadenar un ataque asmático^{26, 27}.

Al igual que la pilocarpina, existen fármacos cuyos usos en la terapéutica o en la investigación han brindado información sobre sus usos frente a cierto tipo de receptores muscarínicos, tal es el caso de la oxotremorina. La oxotremorina es un alcaloide sintético, agonista muscarínico, que actúa preferentemente sobre receptores M₂/M₄ que son conocidos por mediar el efecto inhibitorio de las neuronas colinérgicas y poseen una alta afinidad a los receptores muscarínicos de tipo 2 con respecto a otros fármacos²⁸. Asimismo, la oxotremorina es un agonista parcial y agonista total de los receptores M₁ y M₂ respectivamente, mientras que la oxotremorina-M (es el derivado de amina cuaternaria de la oxotremorina que se obtiene de la reacción de yoduro de metilo con un aldehído o cetona), es un agonista total para ambos tipos de receptores²⁹. De igual manera, existen fármacos que son sustratos de enzimas que están acopladas a la cascada de las proteínas G activadas, tal es el caso de la 2',5'-dideoxiadenosina, fármaco que actúa como regulador positivo de la enzima adenilato ciclasa, la cual se encarga de la transformación de AMPc a partir de ATP, y cuya activación está ligada a la estimulación de proteínas G_s y a la inhibición de G_{i/o}^{30,31}.

3.5 Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias

La medicina tradicional mexicana se usa ampliamente para tratar padecimientos respiratorios como el asma. Algunas plantas que han sido estudiadas farmacológicamente para tratar estos padecimientos son: *Argemone ochroleuca* (chicalote)¹, *Gnaphalium liebmannii* (gordolobo)³², *Bougainvillea spectabilis* (bugambilia), *Bursera simaruba* (copal), *Croton glabellus* (cascarilla) y *Thymus vulgaris* (tomillo), entre otras^{33, 34, 35}. Sin embargo, a pesar de su amplio uso las investigaciones científicas para determinar su valor terapéutico aún son limitadas.

La medicina tradicional ha tenido gran importancia en las enfermedades respiratorias ya que los anticolinérgico, metilxantinas y cromonas han tenido su origen en tratamientos herbales³. Por esta razón, en la actualidad se siguen las mismas prácticas médicas tradicionales como fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos^{36, 37}, así como, el uso de los compuestos de origen natural como materia prima para la síntesis de fármacos y construcción de prototipos estructurales en el desarrollo de fármacos análogos con una mayor actividad biológica.

En la medicina tradicional mexicana a varias especies de *Argemone* se les conoce como “Chicalote” y son utilizadas en el tratamiento de enfermedades respiratorias, dermatológicas y afecciones oculares^{4, 5, 38}. En el Valle de México pueden encontrarse dos especies: *Argemone platyceras* Link & Otto y *Argemone ochroleuca* Sweet. Se tiene reportado que para la especie *Argemone platyceras* Link & Otto, el flavonoide isoquercitrina inhibe las contracciones inducidas por carbacol³⁸, mientras que, en el caso de *Argemone ochroleuca* Sweet uno de los principios activos relajantes identificados es el alcaloide berberina^{1, 5}.

3.6 Los alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios nitrogenados generalmente de carácter básico y fisiológicamente activos. La mayoría de estos compuestos son biosintetizados a partir de aminoácidos^{40,41}. Los alcaloides pueden ser derivados de fuentes vegetales, así como, derivados de bacterias y animales, junto a compuestos sintéticos no presentes en las plantas. Los alcaloides suelen dividirse en alcaloides verdaderos (aquellos cuyo nitrógeno forma parte de un heterociclo y provienen a partir de aminoácidos), protoalcaloides (aquellos en donde el nitrógeno no forma parte de un heterociclo, pero derivan de aminoácidos) y pseudoalcaloides (son aquellos en los que el nitrógeno forma parte de un heterociclo, pero no se derivan de aminoácidos) y presentan diversas funciones en las fuentes vegetales, tales como: ser partícipes en las secuencias metabólicas de la planta, ser un medio de almacenamiento y transporte de determinados ácidos vegetales, participar en los procesos de germinación y conferir protección a las plantas que los contienen⁴¹.

3.6.1 Las protoberberinas

Las protoberberinas son alcaloides tetracíclicos cuaternarios o terciarios ampliamente distribuidos. Como los demás alcaloides isoquinolínicos, las protoberberinas se forman a partir de un benciltetrahydroisoquinoleína: el carbono C-8 proviene de la ciclación oxidativa del *N*-metilo de una molécula de este tipo. Esta ciclación, catalizada por una enzima BBE (berberine bridge enzyme), haría necesaria la intervención del ion metilen iminio (H_2CN^+), el cual corresponde a la oxidación del *N*-metilo, que al reaccionar en *-orto* o *-para* del fenol libre situado en el ciclo C, conduce a la formación de una tetrahidroprotoberberina 2,3,9,10-tetrasustituida o a su homólogo⁴². La oxidación y reagrupamiento de las tetrahidroprotoberberinas, poseen propiedades farmacológicas como la bicuculina, la cual posee una actividad antagonista del ácido gamma-amino butírico, la narcotina, que presenta propiedades antitusivas⁴², así como, la berberina, la cual

se tiene reportada como astringente en inflamación de mucosas, antiséptico⁴³ y antagonista de receptores muscarínicos^{4, 32}.

3.6.2 La berberina

La berberina (9,10-dimetoxi-5,6-dihidro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquino[3,2-a]isoquinolin-7-io) es uno de los principios activos relajantes del músculo liso bronquial identificados de *Argemone ochroleuca*¹¹, es un alcaloide isoquinolínico⁴², cuyo precursor es el aminoácido *L*-tirosina. Los cationes iminios de la berberina se caracterizan por la sensibilidad en su enlace polar C=N⁺ al ataque nucleofílico resultando en la formación de derivados con sustituyentes en la posición 8⁴². Suele presentarse como un sólido cristalino en forma de agujas de color amarillo, soluble en agua y etanol pero insoluble en benceno, éter y cloroformo. Su forma aislada se presenta siempre como una sal ácida (clorhidrato, sulfonato y carbonato)¹. Con respecto a su estructura, presenta un esqueleto biológicamente importante y atractivo para su modificación en busca de mayor selectividad y discriminación⁴².

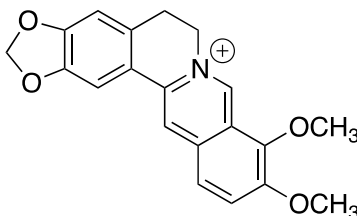


FIGURA 1. Estructura de berberina.

Además de tener efectos antagonistas sobre los receptores colinérgicos muscarínicos³¹, la berberina posee varios efectos farmacológicos contra enfermedades como: la hiperlipidemia, el síndrome metabólico, el síndrome de ovario poliquístico, la obesidad, enfermedades del hígado graso y enfermedades en la arteria coronaria^{39, 43, 44}, así como, poseer propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. De igual manera, existen reportes de pruebas clínicas en tratamientos para diarrea, tratamiento de tracoma, diabetes *mellitus* tipo II, hipercolesterolemia e insuficiencia cardiaca congestiva^{42, 43, 44}. Por ello, se ha definido como un posible fármaco potencial debido a su amplio espectro en

aplicaciones clínicas. De igual forma, se tiene reportado que es capaz de interactúa directamente con los ácidos nucleicos y varias proteínas incluyendo las telomerasas, DNA topoisomerasas, p53, NF-κB, MMPs y receptores de estrógeno⁴⁵.

Se tiene reportado que a altas dosis las sales aisladas de berberina son moderadamente tóxicas, para el clorhidrato dihidratado de berberina (BCD, por sus siglas en inglés) administrado por vía intraperitoneal se ha reportado una LD₅₀ de 30mg/Kg y 205 mg/Kg en ratón y rata respectivamente⁴⁶. En el caso de la LD₅₀ de sulfato de berberina administrada de manera oral en ratas ha sido reportada mayor a 1000 mg/Kg. Estas dosis están muy lejos de las que pueden ser utilizadas en la clínica o las que contienen las plantas, las cuales en promedio, tienen presentes de un 0.5 - 7% de berberina⁴⁷. Asimismo, se tiene reportado el nivel de exposición experimental al cual no se observan efectos tóxicos (NOAEL, por sus siglas en inglés), tanto en las ratas como en los ratones, siendo aproximadamente 500 veces mayor a la máxima cantidad de berberina que puede ser obtenida de una plantas que se utiliza como suplemento alimenticio^{46, 48}. Además se han reportado varios estudios donde se demuestra el efecto inhibidor de la berberina sobre la citotoxicidad inducida por agentes químicos, peroxidación de lípidos y el estrés oxidativo en el hígado⁴⁹, pero los síntomas que han sido identificados por una sobredosis incluye hipotensión, bradicardia, disnea y trastornos gastrointestinales⁵⁰.

3.7. Potencia relativa antagonista (pA₂)

La potencia relativa antagonista (pA₂) fue introducida por Schild en 1947 como una medida empírica del antagonismo farmacológico⁵¹. El gráfico de Schild es un método farmacológico de clasificación de los receptores. Para su construcción, la curva de dosis-efecto de un agonista se determina en presencia de diversas concentraciones de un antagonista, cuya relación está dada entre las concentraciones de agonista para producir un efecto específico en presencia del antagonista a la dosis requerida en ausencia del mismo⁵².

El valor de pA_2 se utiliza para comparar antagonistas en un mismo sistema que permite cuantificar el grado de antagonismo de una misma molécula por diversos receptores, lo que nos permite tener una idea de su selectividad y distinguir entre subtipos de receptores⁵¹. Por lo tanto, el pA_2 es una medida de la afinidad del antagonista por los receptores, por lo que un valor de pA_2 grande indica un mayor antagonismo²⁴.

El pA_2 , que puede definirse, como el logaritmo del inverso de la concentración molar de antagonista que hace necesario duplicar la concentración del agonista para obtener el mismo efecto que cuando el antagonista no está presente⁵¹.

La ecuación que lo representa es:

$$\text{Log} ((A'/A)-1) = \log B - \log K_B$$

Donde A es la CE_{50} del agonista en ausencia del antagonista, A', es la CE_{50} de agonista en presencia del antagonista, K_B , es la constante de afinidad para el antagonista y B, es la concentración (μM) del antagonista.

Se lleva a cabo una regresión lineal cuya intersección en el eje de las x es una estimación de pA_2 , este valor es un estimado constante de equilibrio de disociación para el antagonista, así como, la dosis de antagonista que se requiere para aumentar al doble la concentración de agonista para obtener un mismo efecto.

Una modificación de la ecuación de Schild para antagonismo no competitivo es la siguiente:

$$\text{Log} (X-1) = b + m * (-\text{Log} B)$$

En donde:

$$X = \frac{\text{Emáx del agonista en ausencia del antagonista (A)}}{\text{Emáx del agonista en presencia de una concentración de antagonista (A')}}$$

B = es la concentración del antagonista

b = es la ordenada al origen

m = es la pendiente

Para distinguirla del pA_2 del antagonismo competitivo se utiliza una apóstrofe (pA_2')⁵³, por lo que la ecuación propia de pA_2 para antagonismo no competitivo queda como:

$$pA_2' = pB_x' + \log (x-1)$$

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación del mecanismo de acción de los productos naturales nos permite identificar su acción farmacológica definida en el organismo e identificar su selectividad. En el caso particular de berberina, a la cual se ha demostrado que posee efectos relajantes de la musculatura lisa bronquial, por su acción como antagonista colinérgico, es de interés conocer sobre qué subtipo de receptores muscarínicos actúa. Para ello se utilizó como estrategia el uso de agonistas muscarínicos preferentemente M_2 y M_3 , para medir el efecto antagonista de la berberina en tráquea aislada de cobayo, la cual es un modelo adecuado relacionado con la fisiopatología de las vías respiratorias de los seres humanos. La importancia de conocer la selectividad de un fármaco, radica en que a mayor selectividad son menores los efectos secundarios, adicionalmente, existen pocos fármacos antagonistas selectivos de los subtipos de receptores muscarínicos, por lo que la berberina podría ser uno de estos.

5. HIPÓTESIS

Considerando que la berberina actúa sobre receptores muscarínicos, se espera que ejerza una acción antagonista preferentemente sobre receptores M_3 en relación a los receptores M_2 , por lo que se plantea que la berberina antagonice con mayor potencia las contracciones inducidas por pilocarpina, un agonista preferente M_3 , con respecto a las contracciones inducidas por oxotremorina, un agonista con preferencia por los receptores muscarínicos M_2 en tráquea aislada de cobayo.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar a los subtipos de receptores muscarínicos implicados en el efecto antagonista de berberina en el músculo liso aislado de tráquea de cobayo, utilizando la potencia antagonista de agonistas colinérgicos que actúan sobre diferentes subtipos de receptores muscarínicos.

6.2 Objetivo específico

- Determinar las CE_{50} de cada uno de los fármacos contráctiles clorhidrato de acetilcolina, clorhidrato de carbacol, nitrato de pilocarpina, y sesquifumarato de oxotremorina en el modelo aislado de tráquea de cobayo.
- Determinar el potencial antagonista de berberina con respecto a cada uno de los fármacos agonistas colinérgicos contráctiles (clorhidrato de carbacol, clorhidrato de acetilcolina, nitrato de pilocarpina, y sesquifumarato de oxotremorina) en el músculo liso de tráquea de cobayo.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Fármacos

Se utilizó sulfato de berberina comercial, así como, cuatro fármacos contráctiles de tipo colinérgico: clorhidrato de acetilcolina, clorhidrato de carbacol, nitrato de pilocarpina, sesquifumarato de oxotremorina y 2',5'-dideoxiadenosina adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis Mo. USA)

7.2 Animales.

Para los experimentos se utilizaron cobayos macho con un peso corporal de 300-450 g mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) con libre acceso de agua y alimento. El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Cuidado y Manejo de Animales. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

7.3 Ensayos biológicos

7.3.1 Disección de la tráquea y estabilización del tejido

Los animales se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.), inmediatamente se realizó la disección de la tráquea limpiándola del tejido circundante y se colocó en solución de Krebs cuya composición fue (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaH₂PO₄ 1.2, MgSO₄•7H₂O 1.2, CaCl₂•2H₂O 2.5, NaHCO₃, 25.0, 2H₂O, glucosa 11.1 y EDTA. Esta solución se mantuvo a 37°C y con burbujeo constante de 5% CO₂ y 95% O₂¹. Posteriormente del tejido se obtuvieron 8 anillos de aproximadamente 2 mm de longitud, cada uno y se colocaron en una cámara para órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs a 37 °C. El tejido se suspendió entre dos ganchos de alambre de Nicromel, uno de los extremos se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (Grass FT 03E) conectado a un

polígrafo Biopack System. Los datos se obtuvieron mediante el programa Acknowledge MP100 versión 3.5.3. El tejido se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se dejó estabilizar por una hora, realizando lavados con disolución de Krebs cada 15 minutos durante este periodo. Trascurrida la hora, se procedió a estimular con una solución de acetilcolina 30 μM dos veces a intervalos de treinta minutos, después de la estimulación, los órganos se lavaron 2 veces con solución de Krebs, posteriormente se permitió que la preparación se equilibrará por 30 minutos antes de comenzar los experimentos.

7.3.2 Evaluación del efecto contráctil de los fármacos agonistas

El tejido previamente preparado y estabilizado fue contraído mediante la realización de una curva de contracción acumulativa de cada uno de los fármacos agonistas en experimentos independientes. Las concentraciones utilizadas para carbacol fueron de entre 0.0001-300 μM , para pilocarpina de 0.01-300 μM y en el caso de oxotremorina se utilizaron concentraciones entre 0.001-100 μM y para acetilcolina fueron de 0.0001-1000 μM . Al finalizar la curva se realizó un periodo de lavado con disolución de Krebs, cada 15 minutos durante una hora. Una vez concluido este periodo se llevó a cabo un segundo periodo de estabilización de 1 hora donde se alcanzó una contracción basal constante.

7.3.3 Efecto antagonista de la berberina

Una vez que el tejido alcanzó la contracción basal constante se incubó durante un periodo de 20 minutos a concentraciones diferentes de berberina (entre 25 a 300 μM) por canal. Después de este tiempo se procedió a realizar la curva de contracción acumulativa del fármaco contráctil en las concentraciones antes mencionadas. En cada experimento se corrió un experimento control, el cual se estimuló con el fármaco contráctil en ausencia del antagonista berberina.

7.3.4 Efecto antagonista de la berberina en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina

En un experimento independiente, se realizó la evaluación de berberina en presencia y en ausencia de 2',5'-dideoxiadenosina. Una vez que el tejido alcanzó la contracción basal constante se incubó la 2',5'-dideoxiadenosina a una concentración de 10 μM durante un periodo de 5 minutos hasta alcanzar una meseta constante. Después de este tiempo se procedió a incubar con berberina 100 μM por 20 minutos. Trascurrido este tiempo, se realizó la curva de contracción acumulativa de carbacol en las concentraciones antes mencionadas. En cada experimento se corrió un control, el cual se estimuló con el fármaco contráctil en ausencia de berberina y de 2',5'-dideoxiadenosina. Así mismo, se corrieron dos experimentos testigo, el primero se estimuló con carbacol en presencia de berberina 100 μM y el segundo se estimuló con carbacol en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina.

7.3.5 Análisis estadístico y cálculo de parámetros

Los datos fueron presentados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) con un nivel de confianza del 95 %. De los experimentos individuales, se determinaron las CE_{50} de cada uno de los fármacos tanto en presencia como en ausencia del antagonista mediante el modelo de Hill, utilizando el software Graphpad Prism[®] versión 5.00, las curvas dosis respuesta y la CE_{50} se compararon con respecto al control mediante una prueba de *t* de Student. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$. Se calculó el potencial antagonista de acuerdo a la ecuación de Schild: $\text{Log}((A'/A)-1) = \text{Log} B - \text{Log} K_B$, donde A es la CE_{50} del fármaco contráctil en ausencia del antagonista, A' es la CE_{50} del fármaco contráctil en presencia del antagonista y K_B es la constante de afinidad para el antagonista y B es la concentración (M) del antagonista. El valor de pA_2 es la abscisa al origen cuando $A'/A = 2^{51}$.

8. RESULTADOS

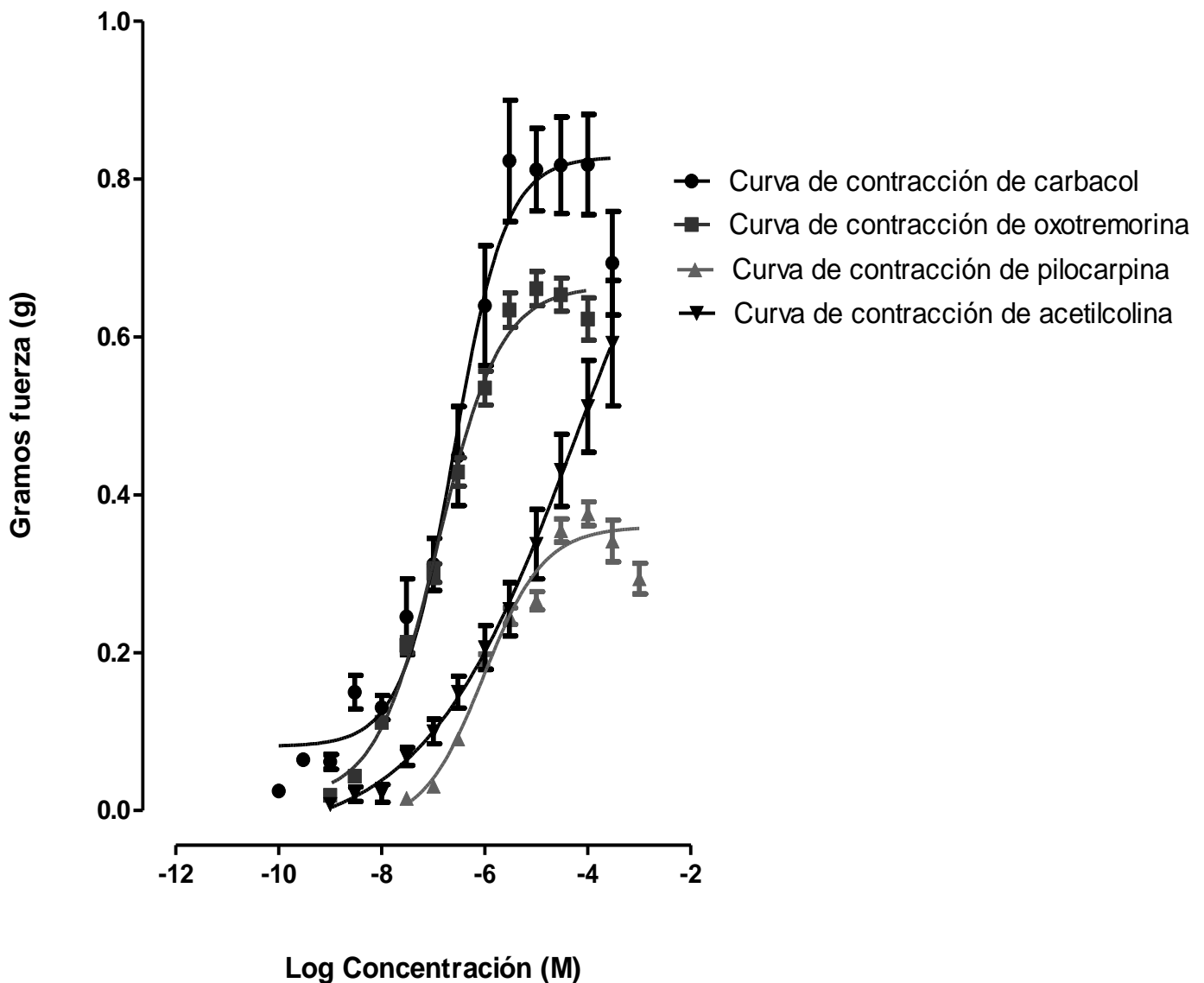
En la **Gráfica 1**, se muestra las contracciones llevadas a cabo por los diferentes fármacos agonistas, siendo el carbacol el que presenta la mayor eficacia de contracción en gramos fuerza y una mayor potencia en un rango de concentraciones de 1×10^{-10} a 1×10^{-3} M. Además, puede observarse que para el caso de la curva de acetilcolina a la concentración de 1×10^{-3} aún no se observa la contracción máxima llevada a cabo por el fármaco.

La berberina (100, 150 y 200 μ M) antagoniza la respuesta contráctil de carbacol, se observó que se produce un desplazamiento paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de carbacol (**Gráfica 2**). Los valores de CE_{50} se muestran en el **Cuadro 2**, observándose una diferencia significativa entre las CE_{50} del carbacol en ausencia de berberina con respecto a aquellas en presencia de berberina. La **Gráfica 3**, presenta la gráfica de Schild y el valor de pA_2 de 4.188 ± 0.33 , correspondiente a la concentración de berberina de $6.48 \times 10^{-5} \pm 0.46$ M (64.9 ± 4.6 μ M).

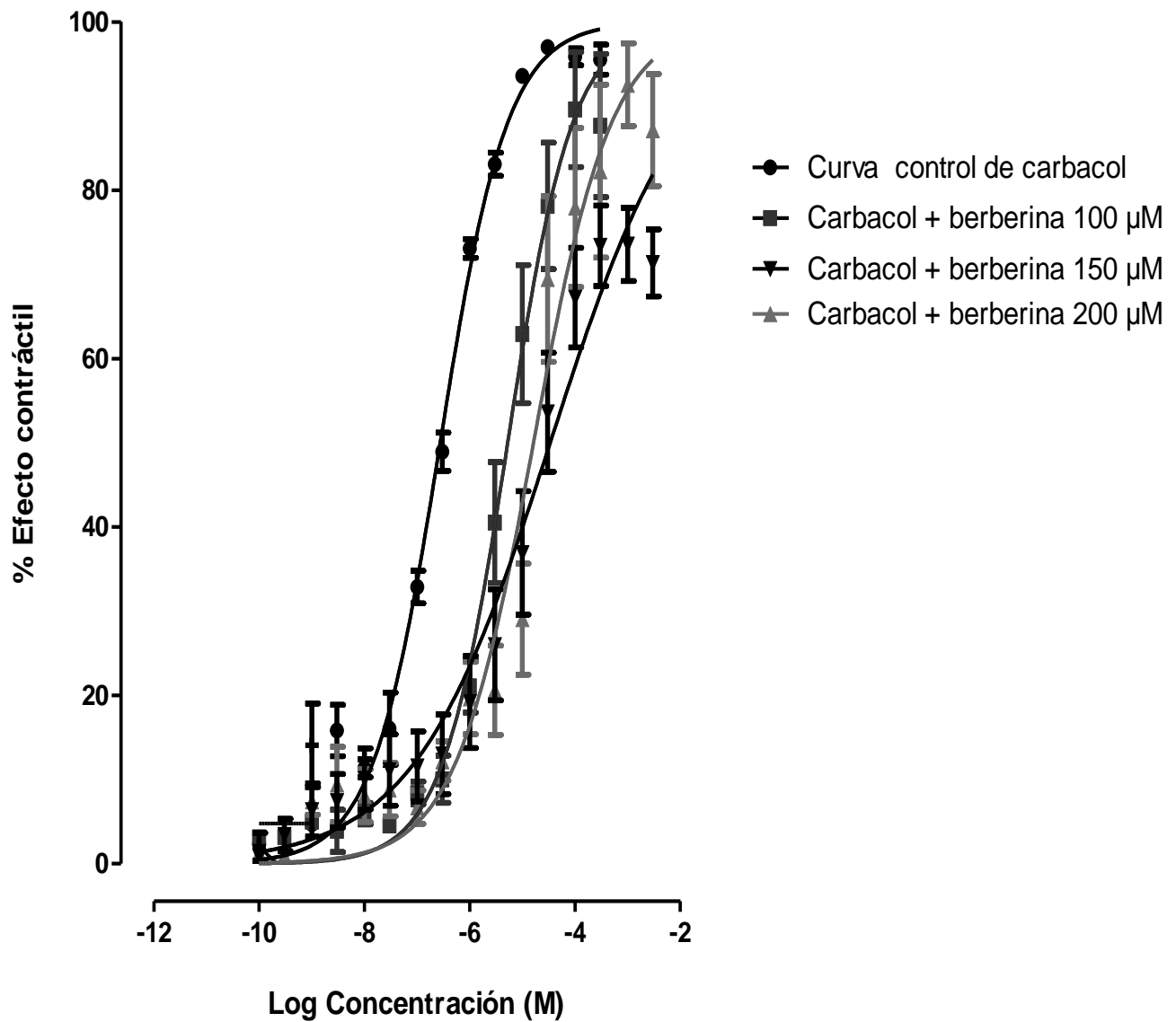
Se observó un desplazamiento paralelo hacia la derecha de la curva concentración - respuesta de pilocarpina en presencia de berberina (25, 37, 50, y 75 μ M), como se muestra en la **Gráfica 4**. Los valores de CE_{50} se muestran en el **Cuadro 3**, observándose una diferencia significativa entre las CE_{50} de pilocarpina en ausencia de berberina con respecto a las curvas en presencia de berberina. La **Gráfica 5**, presenta la gráfica de Schild y el valor de pA_2 de 4.686 ± 0.307 , correspondiente a la concentración de berberina de $2.06 \times 10^{-5} \pm 0.493$ M (20.6 ± 4.93 μ M).

Berberina (100, 200 y 300 μ M) provocó un desplazamiento paralelo hacia la derecha de la curva concentración – respuesta de oxtremorina, como se observa en la **Gráfica 6**. Los valores de CE_{50} (**Cuadro 4**), muestran una diferencia significativa entre las CE_{50} de oxtremoria en ausencia de berberina con respecto a las curvas en presencia de berberina. La **Gráfica 7**, presenta la gráfica de

Schild y el valor de pA_2 de 4.294 ± 1.036 , correspondiente a la concentración de berberina de $5.082 \times 10^{-5} \pm 0.092$ M (50.82 ± 0.92 μ M).



Gráfica 1. Curva concentración-respuesta de la contracción en gramos fuerza de los fármacos agonistas de los receptores muscarínicos (carbacol, oxotremorina, acetilcolina y pilocarpina) utilizados para contraer los anillos de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

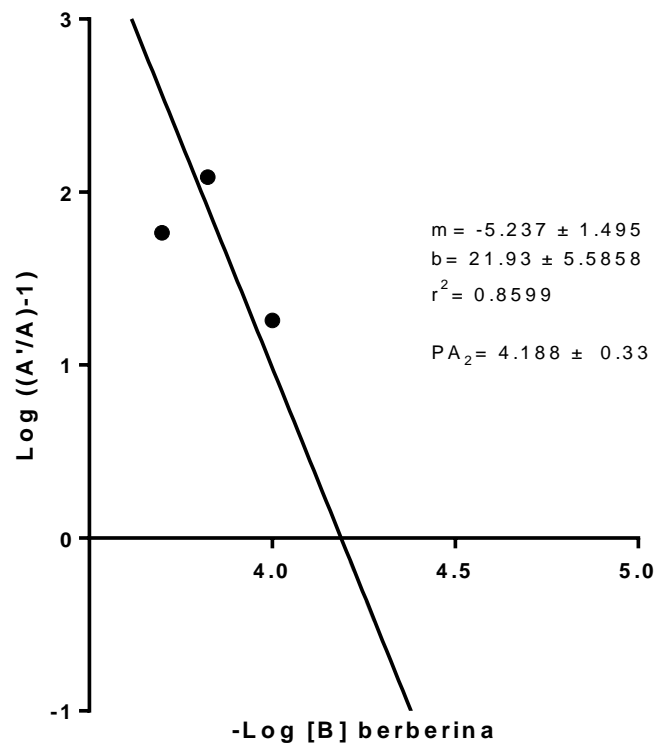


Gráfica 2. Curva de contracción inducida por carbacol en presencia de berberina (■ 100 µM, ▼ 150 µM ▲ 200 µM). Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

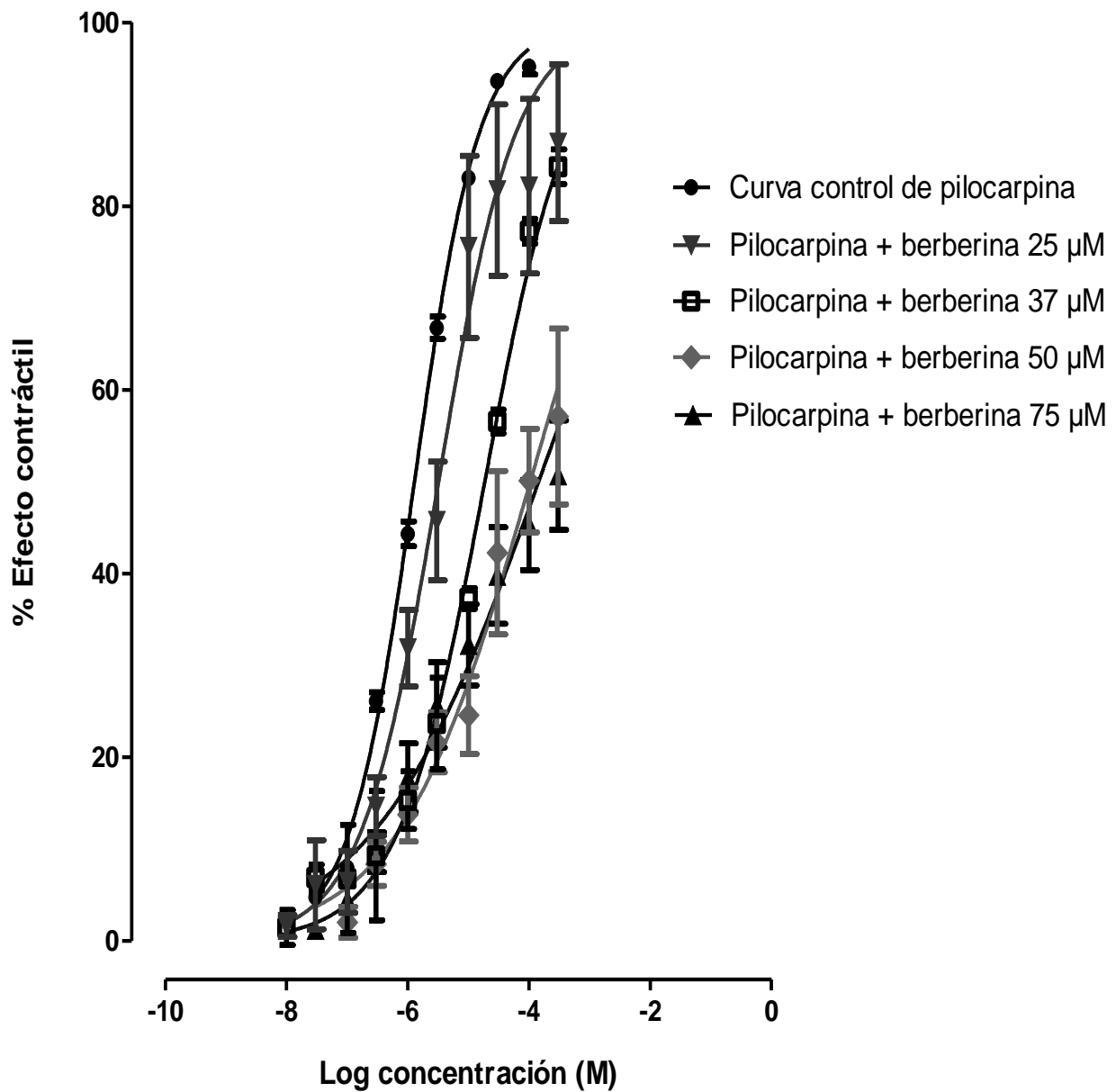
Cuadro 2. Valores de CE_{50} (μM) de carbacol en ausencia y presencia de berberina.

Concentración de berberina (μM)	Carbacol CE_{50} (μM)
0	0.274 ± 0.0131
100	$5.26 \pm 0.968^*$
150	$33.8 \pm 2.0336^*$
200	$16.3 \pm 2.4286^*$

Los valores de CE_{50} se presentan como la media \pm EEM (μM) de al menos 6 experimentos. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t de Student* $p < 0.05^*$.



Gráfica 3. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con respecto a carbacol. Las concentraciones utilizadas de berberina fueron de 100, 150 y 200 μM .

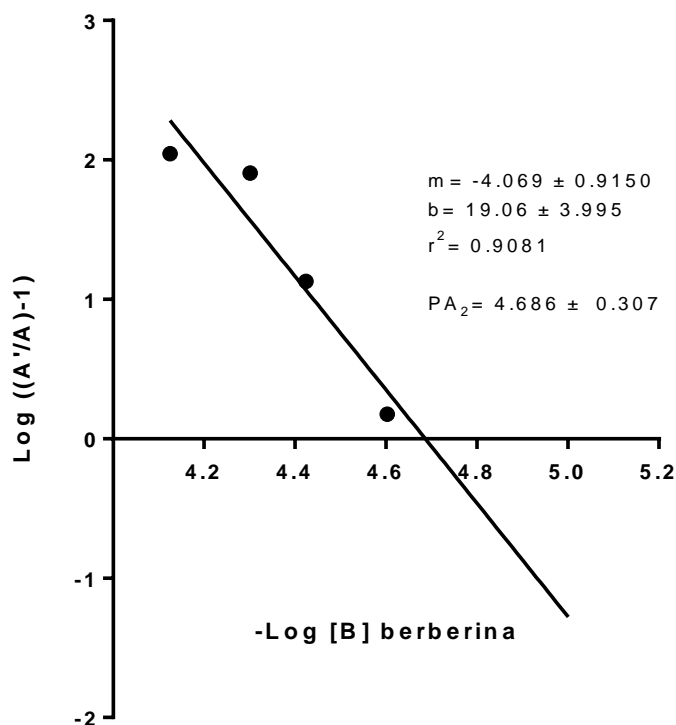


Gráfica 4. Curva de contracción inducida por pilocarpina en presencia de berberina (▼ 25, ■ 37 μ M, ◆ 50 μ M, ▲ 75 μ M). Cada punto representa el promedio \pm EEM de al menos 6 experimentos.

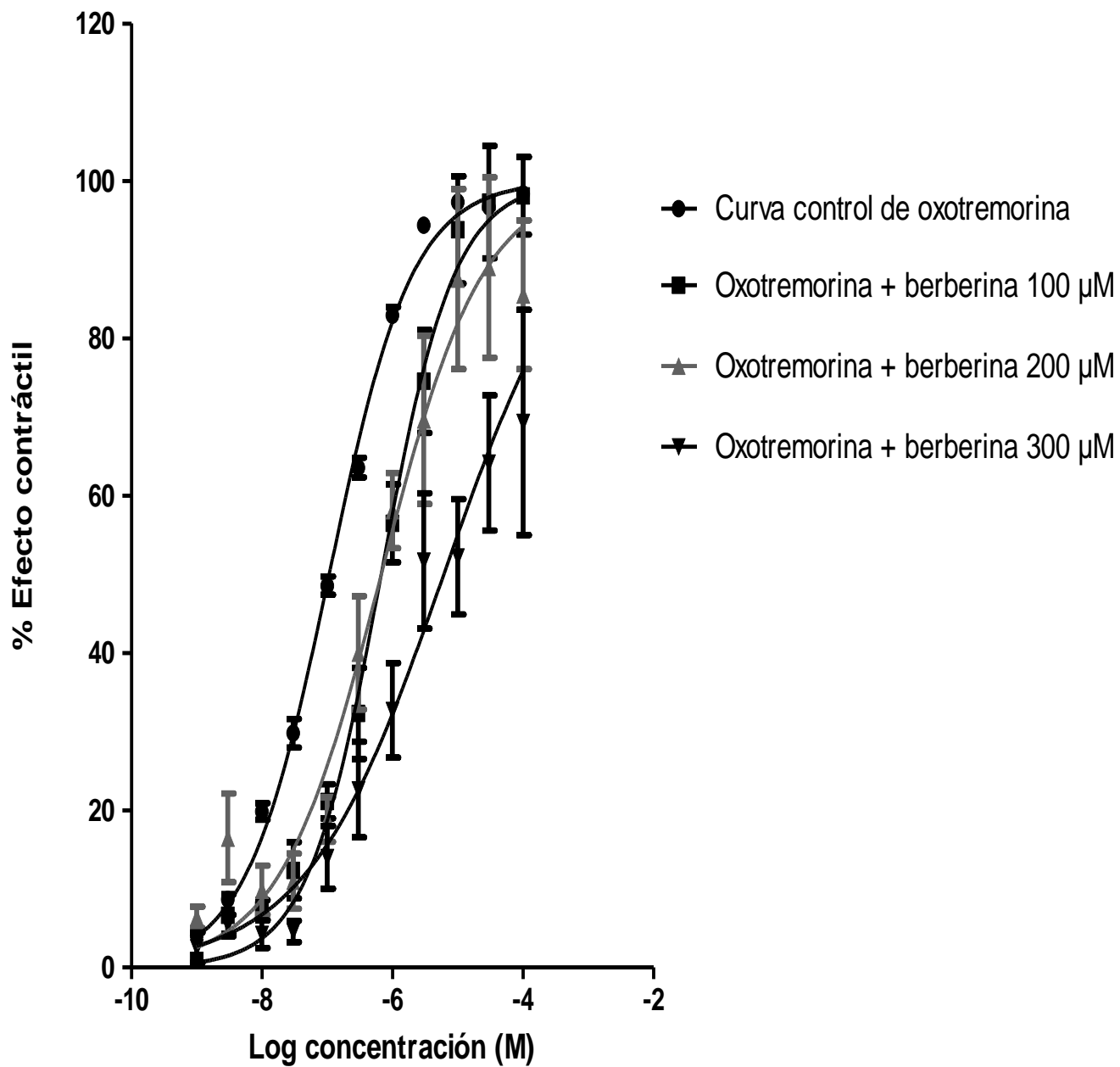
Cuadro 3. Valores de la CE_{50} (μM) de pilocarpina en ausencia y presencia de berberina.

Concentración de berberina (μM)	Pilocarpina CE_{50} (μM)
0	1.29 ± 0.0347
25	$3.22 \pm 0.657^*$
37	$18.7 \pm 2.118^*$
50	$105 \pm 31.274^*$
75	$144 \pm 51.468^*$

Los valores de CE_{50} se presentan como la media \pm EEM de al menos 6 experimentos. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t de Student* $p < 0.05^*$.



Gráfica 5. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con respecto a pilocarpina. Las concentraciones utilizadas de berberina fueron 25, 37, 50 y 75 μM .

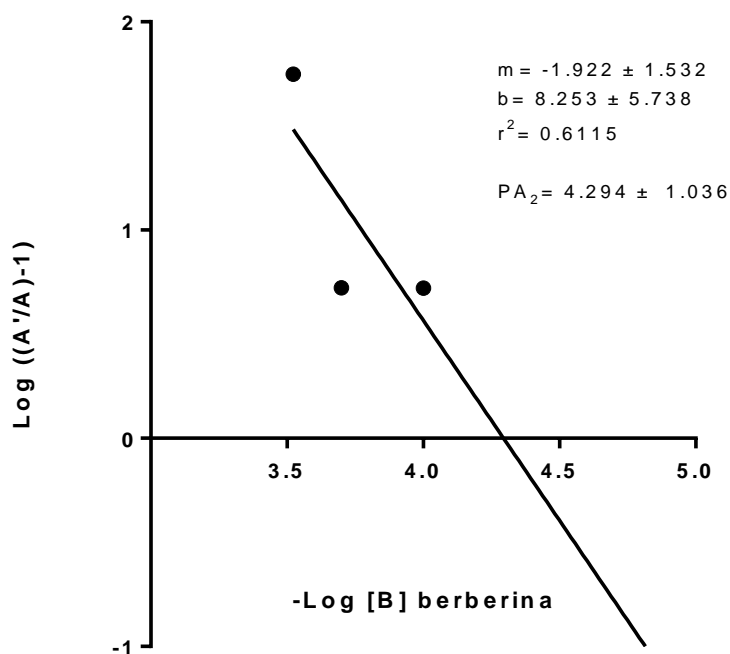


Gráfica 6. Curva de contracción inducida por oxotremorina en presencia de berberina (■ 100 µM, ▲ 200 µM, ▼ 300 µM). Cada punto representa el promedio ± EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 4. Valores de la CE_{50} (μM) de oxotremorina en ausencia y presencia de berberina.

Concentración de berberina (μM)	Oxotremorina CE_{50} (μM)
0	0.107 ± 0.00364
100	$0.672 \pm 0.0996^*$
200	$0.673 \pm 0.141^*$
300	$6.12 \pm 1.66^*$

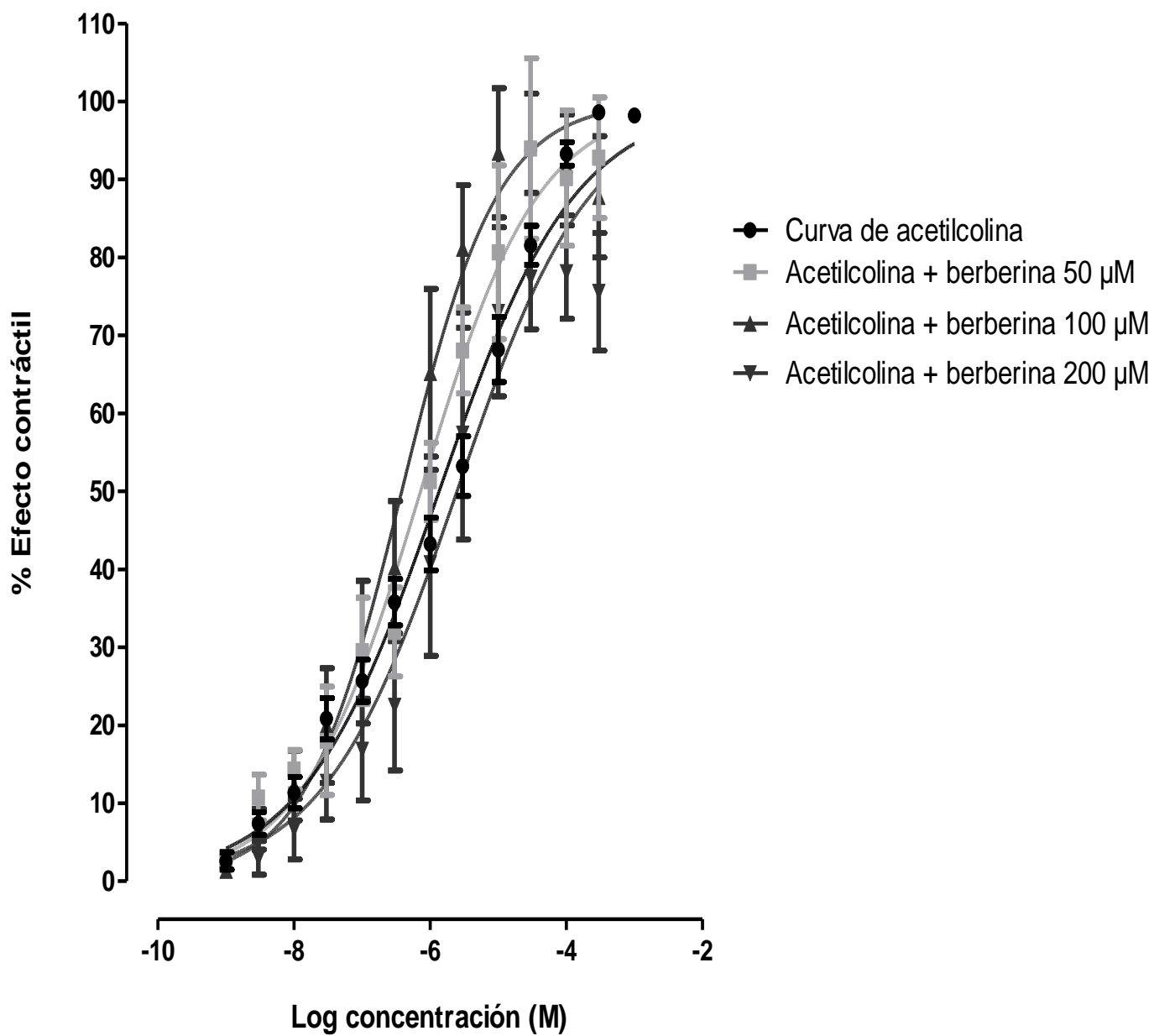
Los valores de CE_{50} se presentan como la media \pm EEM de al menos 6 experimentos. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t de Student* $p < 0.05^*$.



Gráfica 7. Gráfica de Schild para la obtención del pA_2 de berberina con relación a oxotremorina. Las concentraciones utilizadas de berberina fueron 100, 200 y 300 μM .

Para el caso de acetilcolina en presencia de berberina a concentraciones de 50, 100 y 200 μM , se observó un desplazamiento paralelo hacia la izquierda de la curva concentración – respuesta de acetilcolina sola, como se muestra en la **Gráfica 8**. Solo a la concentración de 200 μM se observó el efecto antagonista, pero al desplazarse las curvas a la izquierda impidieron el cálculo de pA_2 . Los valores de CE_{50} de acetilcolina se muestran en el **Cuadro 5**, observando una diferencia significativa entre las CE_{50} de acetilcolina en ausencia de berberina con respecto a las curvas en presencia de berberina 50, 100 y 200 μM .

En la **Cuadro 6** se muestran los valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de cada uno de los fármacos en ausencia de berberina, además de mostrar el valor de pA_2 obtenido en presencia de berberina, y la concentración de berberina correspondiente, se observa que el mayor fue el que se presentó con pilocarpina, sin embargo, éste no fue significativo.



Gráfica 8. Curva de contracción inducida por acetilcolina en presencia de berberina (■ 50 µM, ▲ 100 µM, ▼ 200 µM). Cada punto representa el promedio ± EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 5. Valores de la CE₅₀ (μM) de acetilcolina en ausencia y presencia de berberina.

Concentración de berberina (μM)	Acetilcolina CE ₅₀ (μM)
0	1.36 ± 0.0105
50	0.724 ± 0.179 *
100	0.329 ± 0.089 *
200	2.49 ± 0.763 *

Los valores de CE₅₀ se presentan como la media ± EEM de al menos 6 experimentos. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t de Student* p<0.05*.

Cuadro 6. Valores de la CE₅₀ (μM) de los fármacos contráctiles en ausencia de berberina, valor de pA₂ y la concentración de berberina correspondiente.

Fármaco	CE ₅₀	pA ₂	Concentración de berberina (μM)
Carbacol	0.274 ± 0.0131	4.188 ± 0.33	64.9 ± 4.6
Pilocarpina	1.29 ± 0.0347	4.686 ± 0.307	20.6 ± 4.93
Oxotremorina	0.107 ± 0.00364	4.294 ± 1.036	50.82 ± 0.920
Acetilcolina	1.36 ± 0.0105	-	-

Los valores de CE₅₀ se presentan como la media ± EEM de al menos 6 experimentos y el valor de pA₂ como de berberina obtenido para cada uno de ellos se presenta con su respectiva DE (μM).

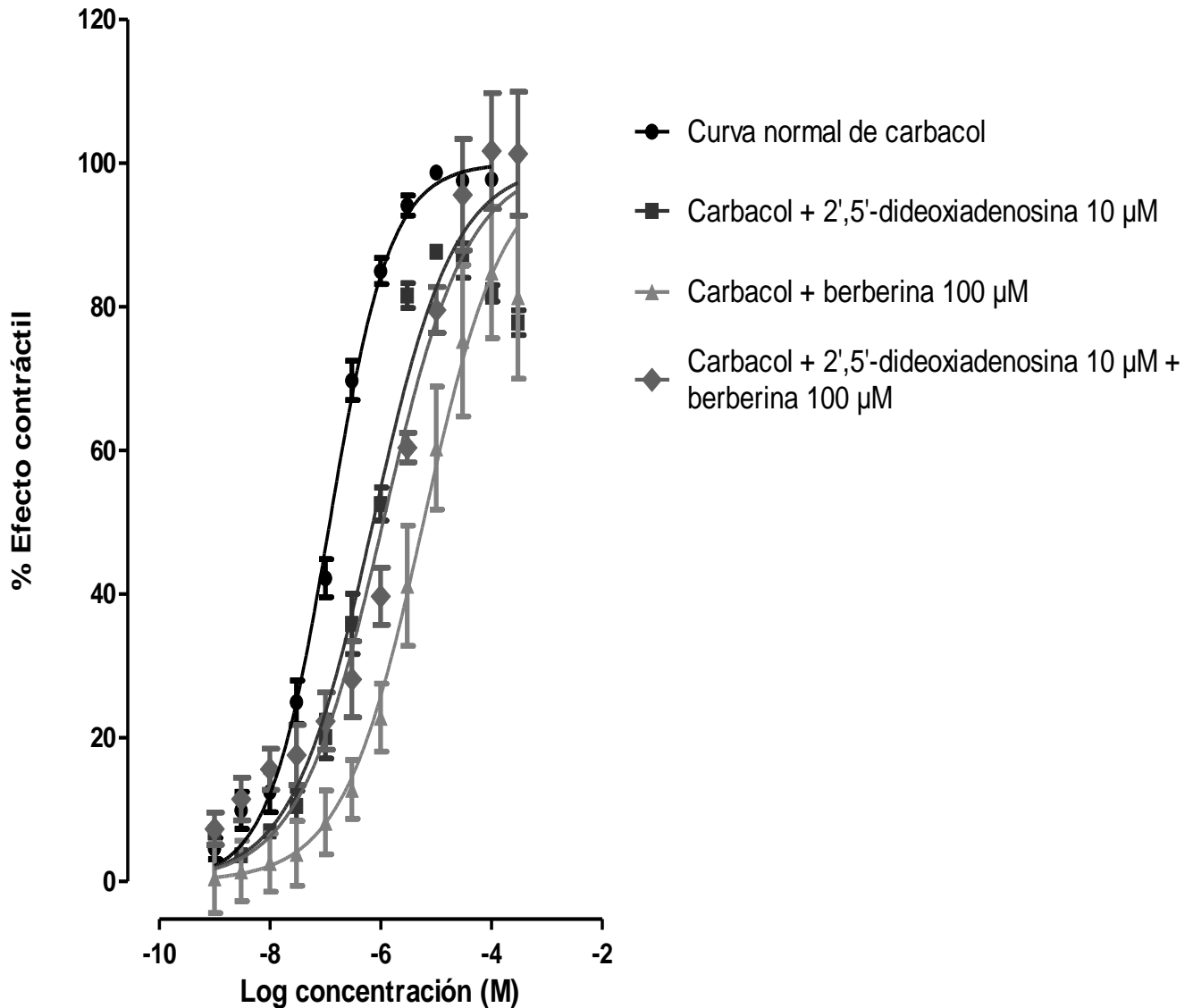
9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que berberina tiene preferencia por antagonizar la respuesta contráctil llevada a cabo por pilocarpina, agonista colinérgico M_3 , pero esta preferencia del receptor no es significativa con respecto al efecto antagonista de berberina para antagonizar los demás fármacos contráctiles, lo que sugiere que el efecto antagonista de la berberina no permite diferenciar las isoformas de receptores muscarínicos M_2 y M_3 .

Con el propósito de dar una explicación del mecanismo de acción de la berberina, se consideró que previamente en nuestro laboratorio^{1, 5} se observó que el efecto relajante de berberina se antagonizaba por la 2',5'-dideoxiadenosina, un inhibidor de la adenilato ciclasa^{30,31}. Se consideró que el efecto antagonista de la berberina se antagonizaba por la 2',5'-dideoxiadenosina, como ocurrió (**Gráfica 9**), en la cual, el inhibidor de la adenilato ciclasa, 2',5'-dideoxiadenosina a la concentración de 10 μM no modificó la respuesta contráctil de carbacol ($CE_{50} = 0.120 \pm 0.0075 \mu\text{M}$ y $CE_{50} = 0.184 \pm 0.041 \mu\text{M}$ respectivamente) (**Gráfica 9, Cuadro 7**), pero si anuló el efecto antagonista de berberina 100 μM ($CE_{50} = 5.908 \pm 1.357$ vs $CE_{50} = 1.103 \pm 0.222 \mu\text{M}$).

Adicionalmente en un trazo típico de contracción isométrica en la preparación del músculo liso de tráquea de cobayo, se observó claramente este efecto opuesto; la berberina relaja el tejido mientras que la 2',5'-dideoxiadenosina lo contrae (**Figura 2**). Lo que puede sugerir que el mecanismo de berberina involucra la activación de adenilato ciclasa, correlacionándolo con lo reportado para berberina como activador de la cinasa de adenosin monofosfato (AMPK, por sus siglas en inglés) en células de colon, hígado y músculo esquelético^{54, 55}. Además, los resultados que se encuentran en el **Cuadro 6**, muestran que no existe diferencia significativa en el valor de la concentración del antagonista (pA_2) para pilocarpina, oxotremorina y carbacol, esto debido a que las concentraciones de berberina obtenidas para provocar que la CE_{50} del agonista se desplace al doble son muy similares dada la ecuación de Schild para antagonismo de tipo competitivo, por lo

que no es contundente una preferencia de berberina sobre los receptores muscarínicos de tipo M_3 , aun cuando estos receptores son los encargados de la contracción del músculo liso bronquial.



Gráfica 9. Curva de contracción inducida por carbacol en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina 10 µM (■), berberina 100 µM (▲) y 2',5'-dideoxiadenosina 10 µM en presencia de berberina 100 µM (◆). Cada punto representa el promedio ± EEM de al menos 6 experimentos.

Como se muestra en la **Gráfica 9**, se observó un desplazamiento paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de carbacol en presencia de berberina ($CE_{50} = 5.908 \pm 1.357$), la cual se vio disminuida cuando se administró de manera concomitante 2',5'-dideoxiadenosina ($CE_{50} = 1.103 \pm 0.222 \mu\text{M}$). Los valores de CE_{50} de las curvas de carbacol, se muestran en el **Cuadro 7**, donde se observa que no existe diferencia significativa entre la CE_{50} de la curva control ($CE_{50} = 0.120 \pm 0.0075 \mu\text{M}$) y la curva en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina 10 μM ($CE_{50} = 0.184 \pm 0.041 \mu\text{M}$). Además, se presentó una diferencia significativa en relación a las CE_{50} entre las curvas de berberina 100 μM sola y la curva de 2',5'-dideoxiadenosina 10 μM sola ($CE_{50} = 0.184 \pm 0.041 \mu\text{M}$).

CUADRO 7. Valores de la CE_{50} presentados como la media \pm EEM (μM) de carbacol en ausencia y presencia de berberina y de 2',5'-dideoxiadenosina.

Compuestos	CE_{50} (μM)
Carbacol	0.120 ± 0.0075
Carbacol + 2',5'- dideoxiadenosina (10 μM)	0.183 ± 0.041
Carbacol + berberina (100 μM)	5.908 ± 1.357 ^{a, b}
Carbacol + 2',5'- dideoxiadenosina (10 μM) + berberina (100 μM)	1.103 ± 0.222 ^{a, b, c}

Los valores de CE_{50} se presentan como la media \pm EEM de al menos 6 repeticiones. La diferencia significativa fue obtenida por una prueba de *t de Student* $p < 0.05^a$ con respecto a la curva control y de *t de Student* $p < 0.05^b$ con respecto a la curva en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina 10 μM y una prueba *t de Student* $p < 0.05^c$ con respecto a la curva en presencia de berberina 100 μM .

En la **Figura 2**, se observó un trazo típico de contracción isométrica en el que claramente se observa el efecto opuesto entre berberina y 2',5'-dideoxiadenosina en la preparación de tráquea aislada de cobayo.

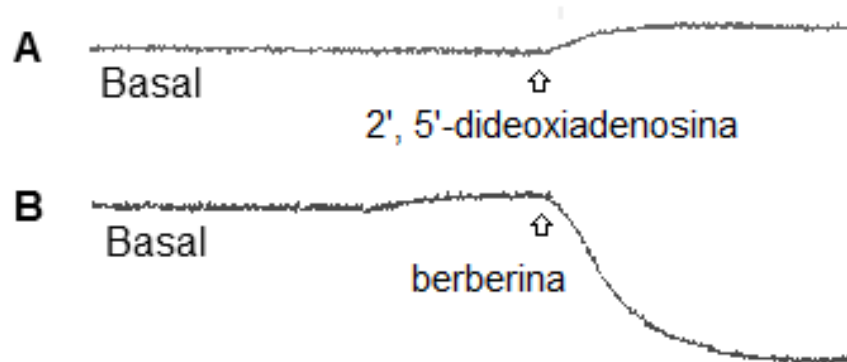


Figura 2. Contracción experimental del anillo aislado de tráquea en presencia de 2',5'-dideoxiadenosina 10 μ M (A) y berberina 100 μ M (B) con respecto a la contracción basal, la flecha (\uparrow) indica el momento en que se administró el compuesto correspondiente.

Estos resultados concuerdan con los observados por Sánchez-Mendoza, et. al., 2008^{1,5}, en la que demuestra que la relajación de berberina y de forskolina (modulador positivo de adenilato ciclasa) se antagoniza por la 2',5'-dideoxiadenosina, lo que da mayor sustento que berberina puede estar actuando como modulador positivo sobre adenilato ciclasa.

Carbacol y acetilcolina son agonistas inespecíficos, por lo que su respuesta contráctil en esta preparación está dada por la activación de los receptores tanto M_3 como M_2 . Al igual, la oxotremorina es un agonista completo, el cual tiene preferencia sobre los receptores M_2 , pero se ha reportado que puede actuar como agonista de los receptores M_3 y es necesario bloquear los receptores M_3 para observar solamente la respuesta contráctil de M_2 ^{56,57}, por lo que su contracción es llevada a cabo por ambos receptores siendo esta mayor a la observada para pilocarpina y por ende, más potente.

En cuanto a pilocarpina, es considerado un fármaco que actúa preferentemente sobre receptores M_3 , pero presenta las características de un antagonista parcial, produciendo la ocupación del 50% de los receptores y produciendo una respuesta menor o igual al 50% de la contracción máxima, generando solamente el 14 % de la contracción producida por carbacol¹⁰, por lo que en la **Gráfica 1**, su respuesta es menor con relación a los demás agonistas. Siendo pilocarpina, un fármaco preferente M_3 , y un agonista parcial, su respuesta es la primera en verse afectada a bajas concentraciones de berberina, como se muestra en el **Gráfico 4**, esto debido a que la respuesta que induce es menor o igual al 50% de la contracción máxima del tejido, lo que permite que se requiera menor concentración de berberina para inhibirse y requiriendo una mayor concentración de pilocarpina para llegar a la contracción máxima en presencia de berberina, lo cual se observa con mejor claridad en la **Cuadro 3**, donde se presentan las CE_{50} en presencia del inhibidor y se observa diferencia significativa a partir de la concentración de 25 μM de berberina.

En el caso particular de acetilcolina, no se logró obtener el valor de pA_2 , esto debido a que las concentraciones de 50 y 100 μM de berberina presentaron valores de CE_{50} menores al valor de CE_{50} de acetilcolina sola aún y cuando la diferencias fueron significativas (**Gráfico 8 y Cuadro 5**). Por lo que no se logró observar el antagonismo de berberina sobre las contracciones inducidas por acetilcolina.

Tomando en cuenta los valores presentados en el **Cuadro 6** y las gráficas de Schild (**Gráficas 3, 5, 7 y 9**) con relación a los valores de pA_2 , la diferencia entre cada uno de los fármacos contráctiles puede deberse a los diferentes factores que están implicados en la respuesta²⁴: 1) las pendientes variables de la representación de Schild, 2) el tipo de agonistas no selectivos y antagonistas selectivos en un tejido con una población heterogénea de receptores implicados en la respuesta, (en donde predominan los subtipo M_2 representando de un 70-80% de la población, en el caso particular de los cobayos, se tiene reportado que la población de receptores decrece de las vías aéreas largas a las pequeñas,

además se tiene reportado que existe una pérdida significativa de los receptores muscarínicos M_2 conforme el animal crece, por lo que se sugiere que la densidad de receptores varía de acuerdo al tamaño y la edad de los animales^{13, 58}), esto se observa en la **Cuadro 1**, en donde la caracterización de los receptores está dada por antagonistas y no por agonistas, debido a que no se han reportado agonistas selectivos a un subtipo de receptores, siendo por ende la caracterización llevada a cabo por diferentes antagonistas selectivos, los cuales pueden ser reversibles o irreversibles, así mismo, a altas concentraciones los antagonistas pueden volverse inespecíficos, debido a que la selectividad depende de la afinidad del fármaco a los diferentes subtipos de receptores y el rango suele ser muy corto, lo que hace difícil la identificación de un receptor específico completamente por este método¹² y en el caso de realizarlo por antagonistas, la metodología a seguir es distinta y no se utiliza la ecuación de Schild para analizar los datos, ya que esta metodología determina el valor de antagonista que hace necesario duplicar la concentración del agonista para obtener el mismo efecto que cuando el antagonista no está presente de manera indirecta.

10.CONCLUSION

La conclusión que se desprende del presente trabajo es:

- Con base a los resultados obtenidos, en los cuales no se observó diferencia significativa del efecto de la berberina para antagonizar las contracciones inducidas por carbacol, acetilcolina, pilocarpina y oxotremorina y a su vez al observarse que el efecto antagonista de berberina fue anulado por la 2',5'-dideoxiadenosina, un inhibidor de la adenilato ciclasa, se sugiere que el efecto de la berberina no está dado por un efecto antagonista sobre los receptores muscarínicos, más bien, es debido a que puede actuar como un activador de la enzima adenilato ciclasa, la cual aumenta los niveles de AMPc provocando un efecto relajante que hasta ahora se había descrito como un efecto antagonista.

11.PERSPECTIVAS

- Realizar una curva de carbacol a diferentes concentraciones de 2',5'-dideoxiadenosina en presencia de berberina 100 μ M.
- Identificar el efecto de berberina sobre la acción de adenilato ciclasa.

12.REFERENCIAS

1. Sánchez-Mendoza, M. E., Castillo-Henkel, C., Navarrete, A.; *Relaxant action mechanism of berberine identified as the active principle of Argemoneochroleuca Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008,60; 229-236.
2. Manual de enfermedades respiratorias 2012: Prevención, diagnóstico y tratamiento. Secretaría de Salud, México, Julio 2012. [Consultado en internet en: 18 de marzo de 2014] Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/214812260/Manual-de-Enfermedades-Respiratorias-Agudas-Prevencion-Diagnostico-y-Tratamiento>
3. Boletín 2009: Enfermedades respiratorias, un reto para la salud pública, secretaría de salud, [Consultado en internet en: 18 de marzo de 2014] Disponible en: http://www.conadic.salud.gob.mx/prensa/boletines2009/enfermedadesresp_190409.html
4. Insgski N, Nsgsi H., Drugs for the treatment of allergic diseases. *Japanese Journal of Pharmacology*, 2001, 86:275-280.
5. Sánchez-Mendoza, M. E., *Mecanismo de acción relajante de berberina aislada de Argemone ochroleuca Sweet en anillos de tráquea aislada de cobayo. Tesis de Doctorado. IPN, ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, 2007, pp. 3- 40.*
6. Bérube K., Prytherch Z., Job C., Hughes T., Human primary bronchial cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*, 2010, 278; 311-318.

7. Dekkers B., Maarsigh H., Meurus H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proceeding of the American thoracic Society*, 2009, 6:683-692.
8. Belmonte, KE. Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary diseases. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2:297-304.
9. Finkbeiner, W. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respiration Physiology*, 1999, 118:77-83.
10. Barnes, P. Pharmacology of airways smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158:S123-S132.
11. Unidad 8: Aparato respiratorio: procedimientos relacionados, Mc Graw Hill Interamericana [Consultado en internet en: 20 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.mcgraw-hill.es/bcv/guide/capitulo/8448177851.pdf>
12. Amrani, Y, y Panttieri, R. Airway smooth muscle: contraction and beyond. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003, 35:272-276.
13. Roux E., Molimard M., Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *General Pharmacology*. 1998, 31:3:349-356.
14. Racké K., Juergens R. U., Matthiesen S. Review: Control by cholinergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 533: 57- 68.
15. Jiang J., Yan X., Deng Y., Li F., Bao M., Xie Y., Chen X., Xie Q., M₃ muscarinic receptor antagonist bencycloquidium bromide attenuates allergic airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 655: 83-90.

16. Walker J. Gainetdinov R., Feldman D., McFawn P., Caron M., Lefkowitz R., Premont R., Fisher J., G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airways responses induced by muscarinic receptor activation. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 2004, 286:L312-L319.
17. Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H., y Halayko, A.J., Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respiratory Research*, 2006, 7:73.
18. Ehlert, F. J. Pharmacological analysis of the contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in smooth muscle. *Receptors and Channels*, 2003, 9: 261-277.
19. Hall, I.P., Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 15:1120-1127.
20. Fyer, A.D. y Jacoby, D.B., Muscarinic receptor and control of airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158: S154-S160.
21. Thirstrup, S., Control of airways smooth muscle tone. II. Pharmacology of relaxation. *Respiratory Medicine*, 2000, 94: 519-528.
22. Ávila Rosas N., Determinación del mecanismo de acción relajante del aceite esencial de Toronjil morado (*Agastache mexicana* subsp. *Mexicana*) en la musculatura lisa bronquial de cobayo. Tesis de Licenciatura. UNAM, FES Zaragoza, 2013, pp. 6-12.
23. Billington, C. y Penn R. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airways smooth muscle. *Respiratory Research*, 2003, 4(1):2.

24. Gago F., *Bases teóricas de la interacción fármaco-receptor. Tratamiento y representación gráfica de los datos*, 2da edición, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares, 1992, pp. 22-26.
25. Protein Data Bank: Carbachol [Consultado en internet en: 25 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00411>
26. Heller B. J., Laiken N. (2011) Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics: Chapter 9: Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists, 12va edición, McGraw-Hill Professional, USA., 2011, pp. 222-225.
27. Trease G., Evans W. C., Tratado de farmacognosia. Nueva Editorial Interamericana, México, 1986, pp 641.
28. Shabani, S., Foster R., Gubner, N., Phillips, T.J., Mark GP., *Muscarinic type 2 receptors in the lateral dorsal tegmental area modulate cocaine and food seeking behavior in rats*, *Neuroscience*, 2010, 170(2): 559–569.
29. Harada K., Matsuoka H., Sata T., Warashina A., Inoue M. Identification and Role of Muscarinic Receptor Subtypes Expressed in Rat Adrenal Medullary Cells, *Journal of Pharmacological Sciences*, 2011, 117:253-264.
30. Désaubry L., Shoshani I. and Roger A. J. Inhibition of Adenylyl Cyclase by a Family of Newly Synthesized Adenine Nucleoside 3'-Polyphosphates, *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271:14028-14034.
31. Désaubry L., Shoshani I. and Roger A. J. 2',5'-Dideoxyadenosine 3'-Polyphosphates Are Potent Inhibitors of Adenylyl Cyclases *Enzymology: Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271:2380-238.

32. Rodríguez Ramos F., González M., Navarrete A., , Ghaphaliin A and B relax smooth muscle or guinea-pig trachea and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2011, 63:926-935.
33. Huntley, A. y Ernst E. Herbal medicines for asthma: a systematic review. *Thorax*, 2000, 55:925-929.
34. Chu, E. y Drazen, J., Asthma: One hundred years of treatment and onward. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005, 171:1202-1208.
35. Fabricant, D. y Farnsworth, N. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives (suppl 1)*, 2001, 109: 69-75.
36. Waizel H. S. Waizel B. J., Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Revista Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, 2009, 54 (4); 45-71.
37. Ram A., Balachandar S., Viiavananth P., Signgh V. P., Medicinal plants useful for treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current status and future perspectives, *Fitoterapia*, 2011, 82:2:141-151.
38. Fernández J., Reyes R., Ponce H., Oropeza, M., Van Calstereankowski, C. y Campos, M.G. Isoquercitrin forma Argemone Platyceras inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology*; 522, 2005, 108-115.
39. Imanshahidi M, Hosseinzadeth H., Pharmacological and therapeutic effects of berberis vulgaris and its active constituent berberine. *Phytotherapy Research*, 2008, 22: 999-1012.

40. Bruneton J., Farmacognosia, fotoquímica, plantas medicinales, 2da edición, Editorial Acribia, México, 2001, pp 904.
41. Mata, R., Curso de farmacognosia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013, pp. 70-79, 99.
42. Tillhon M., Guamán L., Lombardi P. Scovassi I., Review. Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 84:1260–1267.
43. Codell A., Quinn-Beattle ML, Farnsworth N.R., The potencial of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 2001, 15:183-205.
44. Vuddanda P.R, Chakraborty S, Singh S., Berberine: a potential phytochemical with multi spectrum therapeutic activities; *Drug Evaluations*, 2010, 19:1297-1307.
45. Giri P., Kumar G.S., Isoquinoline alkaloids and their bindings with polyadenylic acid: potential basis of therapeutic action. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2010, 10: 568-577.
46. Jahnke G., Price C. J., Marr m. C., Myers C.B., George J., Developmental Toxicity Evaluation of Berberine in Rats and Mice, Wiley-Liss, Inc. *Birth Defects Research (Part B)*, 2006, 77:195–206.
47. Upton, R. Goldenseal root. *Hydrastis Canadensis.*, Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopeia, 2001.
48. Gardner Z., McGuffin M. American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook, Index 1 Herbal constituent profiles, Berberine. 2da. Edición, CRC Press, 2013, pp. 957-958.

49. Dkhil M. A. Role of berberine in ameliorating *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice, *Biological Research*, 2014, 47:8.
50. Lau CW, Yao XQ, Chen ZY, Ko WH, and Huang Y., Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovasc Drug Reviews*, 2001, 19:234 –244.
51. Tallarida R., Drugs synergism and Dose Effect data analysis. *Chapman & Hall/CRC*, USA, 2000, 21-39.
52. Schild Plot. [Consultado en internet en: 9 de mayo de 2014] Disponible en: <http://facpub.stjohns.edu/~yoburnb/pages/dictimages/schild1.html>
53. Orona Ortiz A., Efecto de la santina y reynosina aislada de *Tanacetum parthenium* sobre la respuesta contráctil del tejido vascular de aorta de rata, Tesis de maestría. UNAM, Ciencias Químicas, 2013, pp. 51.
54. Park J, Mi Seo S, Ju Kim E, Jin Lee Y, Ko Y-G, Ha J, Berberine inhibits human colon cancer cell migration via AMP-activated protein kinase-mediated downregulation of integrin β 1 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426:461-467.
55. Shen N, Huan Y. Shen Z, Berberine inhibits mouse insulin gene promoter through activation of AMP activated protein kinase and may exert beneficial effects on pancreatic β cell. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 694:120-126.
56. Ehlert FJ, Ostrom RS, Comparison of functional antagonism between isoproterenol and M2 muscarinic receptors in guinea pig ileum and trachea. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 288(3):969-976.

57. Sawyer W.G., Ehlert, F. J. Contractile Roles of the M₂ and M₃ Muscarinic Receptors in the Guinea Pig Colon, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998, 284(1):269-277.
58. Fryer, A.d y Jacoby, D.B. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998, 158:S158-S160.